

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
Prof. Dr. Martina Müller-Schilling
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER CHEMISCHEN SYMPATHEKTOMIE
AUF DIE NICHT-ALKOHOOLISCHE STEATOHEPATITIS
ANHAND EINES REIN DIÄTETISCHEN MAUSMODELLS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Siegert

2014

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
Prof. Dr. Martina Müller-Schilling
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER CHEMISCHEN SYMPATHEKTOMIE
AUF DIE NICHT-ALKOHOOLISCHE STEATOHEPATITIS
ANHAND EINES REIN DIÄTETISCHEN MAUSMODELLS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Siegert

2014

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Reiner Wiest
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Martin Loss
Tag der mündlichen Prüfung:	03.02.2015 (Prof. Loss, Regensburg) 17.02.2015 (Prof. Wiest, Bern)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
1. Einleitung	8
2. Hintergrund.....	10
2.1 Pathogenetische Faktoren der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen	10
2.1.1 First hit: Steatosis hepatis	11
2.1.1.1 Ernährungsbedingte Faktoren	11
2.1.1.2 Insulinresistenz: gesteigerte Lipolyse im Fettgewebe	12
2.1.1.3 Gesteigerte de novo Lipogenese.....	13
2.1.1.4 Gestörte intrahepatische Lipid-Oxidation.....	14
2.1.1.5 Gestörter Lipid-Export.....	14
2.1.2 Second hit: Inflammation und Steatohepatitis	16
2.1.2.1 TNF α und andere Zytokine.....	16
2.1.2.2 Oxidativer Stress	20
2.1.2.3 Weitere mögliche Mechanismen	21
2.2 Die Rolle des Sympathischen Nervensystems (SNS)	24
2.2.1 Anatomie der autonomen Leberinnervation	24
2.2.2 Regulation des Energiemetabolismus durch das sympathische Nervensystem	26
2.2.3 Der mögliche Einfluss des SNS auf die Steatosis hepatis	30
2.2.4 Der mögliche Einfluss des SNS auf hepatische Inflammation und Fibrogenese	34
2.3 Tiermodelle zur NASH.....	40
2.3.1 Genetische NASH-Modelle	40
2.3.2 Diätetische NASH-Modelle	42
3. Ziel der Studie	45
4. Material und Geräte	46
4.1 Substanzen.....	46
4.2 Laborgeräte	47
5. Methoden	49
5.1 Tiermodell und Ablauf der chemischen Sympathektomie.....	49
5.2 Aufbereitung und Analyse der Blutproben: Messung der Transaminasen	50

5.3 Messung des hepatischen Lipid-Gehaltes	51
5.3.1 Extraktion der Lipide aus dem Lebergewebe	51
5.3.2 Bestimmung des intrahepatischen Triglycerid-Gehalts	51
5.3.3 Bestimmung des intrahepatischen Gehalts an freien Fettsäuren.....	52
5.3.4 Bestimmung des intrahepatischen Cholesterin-Gehalts.....	53
5.4 Anfertigung und Auswertung histologischer Leberschnitte.....	53
5.4.1 Anfertigung der Hämatoxylin/Eosin-Färbung	53
5.4.2 Anfertigung der Sirius-Red-Färbung	54
5.4.3 Auswertung der gefärbten Schnitte: der NAFLD activity score (NAS)	54
5.5 Durchführung und Auswertung der Fluoreszenz-Immunhistochemie: Tyrosin- Hydroxylase-Färbung von Leber- und Darmgewebe.....	56
5.5.1 Präparation des Gewebes	56
5.5.2 Durchführung der Tyrosin-Hydroxylase-Färbung.....	56
5.5.3 Nachweis der erfolgreichen Sympathektomie	57
5.5.4 Auswertung der intrahepatischen sympathischen Innervation.....	58
5.6 RNA-Isolation und –Analyse	58
5.6.1 Isolation der RNA.....	58
5.6.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA	59
5.6.3 Quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	60
5.7 Statistische Auswertung	62
6. Ergebnisse	63
6.1 Makroskopische Befunde	63
6.1.1 Gewichtsverlauf.....	63
6.1.2 Leber und Milz	63
6.2 Mikroskopische Befunde	65
6.2.1 NASH-Scoring anhand histologischer Schnitte	65
6.3 Intrahepatischer Lipidgehalt.....	69
6.3.1 Freie Fettsäuren (ffA) und Triglyceride (TG).....	69
6.3.2 Cholesterin.....	69
6.4 Transaminasen im Serum: AST und ALT	70
6.5 Ergebnisse der RNA-Untersuchungen: TNF und Collagen-1	71
6.5.1 TNF.....	71

6.5.2 Collagen-1	72
6.6 Fluoreszenz-Immunhistochemie	73
6.6.1 Nachweis der erfolgreichen Sympathektomie anhand TH-gefärbter Dünndarmschnitte.....	73
6.6.2 Veränderung der intrahepatischen sympathischen Innervation im Rahmen der NASH und Einfluss der chemischen Sympathektomie	75
7. Diskussion	79
7.1 Induktion einer NASH durch Paigen-Fütterung.....	79
7.2 Erfolgreiche Inhibition des SNS durch Sympathektomie mittels 6-OH-DA und verstärkter Effekt während NASH	82
7.3 Kompensatorisch gesteigerte sympathische Leberinnervation im Rahmen der NASH ..	84
7.4 Verstärkte hepatische Cholesterin-Akkumulation unter SNS-Inhibition	85
7.5 Unveränderte Inflammation und Fibrose nach Sympathektomie	88
8. Zusammenfassung	91
9. Literaturquellen.....	92
10. Danksagung	112
11. Curriculum Vitae.....	113

Abkürzungsverzeichnis

6-OH-DA	6-Hydroxydopamin
AdipoR	Adiponectinrezeptor
ALT bzw. GPT	Alanin-Aminotransferase bzw. Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Apo	Apolipoprotein
AR	Adrenorezeptor
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
AST bzw. GOT	Aspartat-Aminotransferase bzw. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
ATP	Adenosin-Triphosphat
BMI	Body-Mass-Index
cAMP	cyklisches Adenosin-Monophosphat
CCl ₄	Tetra-Chlor-Kohlenstoff
ChREBP	Carbohydrate response binding protein
CoA	Coenzym-A
CPT	Carnitin-Palmitoyl-Transferase
DNL	de novo Lipogenese
et al.	et altera
ffA	Freie Fettsäuren
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HOC	hepatic oval cells
HSC	Hepatische Sternzellen
HSL	Hormon-sensitive Lipase
IDL	intermediate density lipoprotein
IL	Interleukin
Kon	Tiergruppe Normalfutter <u>ohne</u> Behandlung mit 6-OH-DA
LDL	low density lipoprotein
LPL	Lipoprotein-Lipase
LPS	Lipopolysaccharid
MCD-Diät	Methionin-Cholin-defiziente Diät
MTP	microsomal transfer protein

NaCl	Kochsalzlösung
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NAS	NASH activity score
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NKT-Zellen	Natural-Killer-T-Zellen
NK-Zellen	Natural-Killer-Zellen
NPY	Neuropeptid Y
Paigen	Tiergruppe Paigen-Fütterung <u>ohne</u> Behandlung mit 6-OH-DA
Paigen + Sx	Tiergruppe Paigen-Fütterung <u>mit</u> Behandlung mit 6-OH-DA
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPAR α	Peroxisome proliferators activated receptor alpha
PPAR γ	Peroxisome proliferators activated receptor gamma
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
SHR	Spontan hypertensive Ratten
SNS	Sympathisches Nervensystem
SREBP-1c	Sterol responsive binding protein-1c
Sx	Tiergruppe Normalfutter <u>mit</u> Behandlung mit 6-OH-DA
TG	Triglyceride
TGF	transforming growth factor
T	Tyrosin-Hydroxylase
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
VLDL	very low density lipoprotein
WYR	Wistar-Kyoto-Ratten
α -SMA	alpha smooth muscle actin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Makroskopischer Befund bei Organentnahme.....	65
Abbildung 2: Histologischer Befund H/E-gefärbter Leberschnitte.....	67
Abbildung 3: Histologischer Befund Sirius-Red-gefärbter Leberschnitte	68
Abbildung 4: Intrahepatischer Gehalt an freien Fettsäuren (ffa) und Triglyceriden (TG)	69
Abbildung 5: Intrahepatischer Cholesterin-Gehalt	70
Abbildung 6: Transaminasen AST und ALT im Serum, AST/ALT-ratio	71
Abbildung 7: Expression von TNF im Lebergewebe	72
Abbildung 8: Expression Collagen-1 im Lebergewebe	73
Abbildung 9: TH-Färbung Dünndarm	75
Abbildung 10: TH-Scoring der Leber.....	77
Abbildung 11: TH-Färbung Leber.....	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substanzen	46
Tabelle 2: Zusammensetzung des PBS-Puffers.....	46
Tabelle 3: Laborgeräte.....	47
Tabelle 4: Gruppeneinteilung der Versuchstiere	50
Tabelle 5: Gradeinteilung des NASH-Scoring-Systems	55
Tabelle 6: TH-Scoring der Leber, Abstufung der Zahlenwerte	58
Tabelle 7: Zusammensetzung des Master-Mixes zur reversen Transkription	59
Tabelle 8: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsmixes.....	61
Tabelle 9: Verwendete Primer.....	62
Tabelle 10: Ergebnis der histopathologischen Untersuchung gefärbter Leberschnitte anhand des NAS-Scores nach Kleiner et al.	66

1. Einleitung

Ludwig et al. publizierten 1980 eine Studie mit einer Reihe von Patienten, bei denen histologisch das Bild einer Steatohepatitis nachgewiesen werden konnte, ohne dass eine Ursache für die zugrunde liegende Erkrankung festgestellt werden konnte, wobei vor allem ein wesentlicher Konsum von Alkohol in der Vorgeschichte ausgeschlossen werden konnte (Ludwig et al. 1980). Da es damals noch keinen Namen für diese Erkrankung gab, wurde wegen der histologischen Ähnlichkeiten mit der alkoholischen Steatohepatitis von nun an der Begriff der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen (NAFLD) geprägt. Im Laufe der Zeit wurde klar, dass es sich bei den Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen um ein ganzes Spektrum von Erkrankungen handelt, angefangen mit der gutartigsten Form darunter, der Steatosis hepatis, bei der es sich um eine einfache Akkumulation von Fett innerhalb der Hepatozyten handelt. Während die reine Steatosis hepatis als eine relativ benigne und stabile Kondition gilt, kann sich auf dem Boden dieser einfachen Leberzellverfettung bei einem Teil der Betroffenen die kompliziertere Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) mit zunehmender Schädigung der Hepatozyten, einer lobulären Inflammation und progredienter Fibrosierung des Lebergewebes entwickeln (George et Farrell 2005). Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann diese in einen kompletten fibrotischen Umbau des Leberparenchyms im Sinne einer Leberzirrhose münden und somit als Ursache für einen Teil der vormals als kryptogene Zirrhose bezeichneten Krankheitsverläufe verantwortlich gemacht werden kann (Caldwell et al. 1999). Als Endstadium der Erkrankung kann es wie bei Leberzirrhosen anderer Ätiologie zum Hepatozellulären Karzinom (HCC) kommen (Bugianesi et al. 2002). Bei der Suche nach den auslösenden Faktoren im Laufe der letzten gut 30 Jahre fiel schnell die hohe Koinzidenz der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen mit dem Metabolischen Syndrom auf, sodass diese primäre hepatische Steatose wegen ihren Hauptrisikofaktoren Adipositas, Hypertriglyceridämie, Insulin-Resistenz und Diabetes Mellitus Typ 2 heute auch als die hepatische Manifestation des Metabolischen Syndroms gilt (Marchesini et al. 2003). Während im Laufe der Zeit eine große Anzahl möglicher pathogenetischer Faktoren untersucht wurde, konnten die genauen Mechanismen jedoch, die für die Progression von der benignen Steatose zur Inflammation, Fibrose und gar Zirrhose verantwortlich gemacht werden können, bis zum heutigen Zeitpunkt nicht gänzlich identifiziert werden, sodass es bis

dato auch an einem definitiven medikamentös-therapeutischen Angriffspunkt zur Behandlung der Fettlebererkrankung und ihrer Komplikationen fehlt. Da es im Rahmen des Metabolischen Syndroms einerseits zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems kommt (Lambert et al. 2010), und andererseits in Voruntersuchungen gezeigt werden konnte, dass an der hepatischen Fibrose-Entstehung sympathische Neurotransmitter beteiligt sind (Oben et al. 2004), sollte in der vorliegenden Studie der Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) anhand eines rein diätetischen Mausmodells untersucht werden.

2. Hintergrund

2.1 Pathogenetische Faktoren der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen

Bei der Entstehung der NAFLD geht man nach heutigem Kenntnisstand von einem multifaktoriell bedingten Prozess aus, bei dem sowohl umweltbezogene Ursachen wie verminderte körperliche Aktivität und Überernährung, mit deren Folgeerscheinungen Adipositas und Metabolisches Syndrom, als auch genetische Faktoren eine Rolle spielen. So wurden im Laufe der letzten Jahrzehnte eine Vielzahl von Auslösemechanismen identifiziert, bei deren aufeinander folgender bzw. nebeneinander bestehender Anwesenheit es erst zur Leberverfettung im Sinne einer Steatosis hepatis kommt, die die Leber für weitere Schäden anfällig macht. Diese Überladung der Hepatozyten mit Lipiden kann bei Auftreten weiterer schädigender Einflüsse zur Entzündungsreaktion im Lebergewebe führen, mit zunehmender Leberzellschädigung und Fibrosierung, wobei man dann von einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis bzw. NASH sprechen kann. Im angloamerikanischen Sprachraum wurde hierfür das Modell der „two hits“ geschaffen (Day et al 1998), wobei der „first hit“ – also der erste Schädigungs-Mechanismus – in der Entstehung der Steatose besteht, auf deren Boden sich bei Eintreten eines „second hit“ sich die aggressivere NASH mit der potentiellen Progression bis hin zur kompletten Leberzirrhose und ihren Komplikationen entwickeln kann. Da es jedoch zunehmend klar wird, dass es wohl nicht den einen Faktor gibt, der für den Eintritt in die aggressivere Verlaufsform verantwortlich gemacht werden kann, sondern dass wohl viele verschiedene Mechanismen daran beteiligt sind, geht man heute eher von dem Modell der „multiple parallel hits“ aus (Tilg et al 2010). Im Folgenden soll nun zuerst erläutert werden, welche Mechanismen bei der Pathogenese der Leberzellverfettung, dem „first hit“ beteiligt sind, und anschließend werden die potentiellen „second hits“ behandelt, wobei zunächst verschiedene allgemeine Pathomechanismen vorgestellt werden. Im nächsten Abschnitt werden dann schließlich verschiedene aktuelle Erkenntnisse beschrieben, inwiefern das sympathische Nervensystem diese Faktoren beeinflussen und so möglicherweise einerseits an der Krankheitsentstehung beteiligt sein oder andererseits modulierend auf den Krankheitsverlauf einwirken kann.

2.1.1 First hit: Steatosis hepatis

Die Einlagerung von Fetten in den Hepatozyten beruht im Wesentlichen auf fünf verschiedenen Mechanismen, wobei diese dazu führen, dass die Netto-Aufnahme bzw. Produktion von Lipiden in den Hepatozyten deren Abbau bzw. Abtransport übersteigt: (1) einem gesteigerten Lipid-Angebot durch vermehrte Aufnahme mit der Nahrung; (2) einer verstärkten Freisetzung aus viszeralem und subcutanem Fettgewebe durch Lipolyse im Rahmen der peripheren Insulinresistenz; (3) einer gesteigerten intrahepatischen de novo Lipogenese; (4) einer gestörten intrahepatischen Oxidation und (5) einem gestörten Export von Lipiden aus der Leber mittels VLDL's.

2.1.1.1 Ernährungsbedingte Faktoren

Ein gesteigertes Angebot an Fetten im portalen Blutstrom kann durch eine erhöhte Aufnahme von Lipiden mit der Nahrung verursacht sein. Der Anteil von aus der Nahrung stammenden Triglyceriden am Pool der in der Leber bei der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung gespeicherten Lipide beläuft sich auf ca. 15 % (Donnelly et al. 2005). So haben Studien am Menschen (Westerbacka et al. 2005, Cortez-Pinto et al. 2006) und Tierexperimente (Ahmed et al. 2009, Matsuzawa et al. 2007, Omagari et al. 2008) gezeigt, dass sich unter einer fett-reichen Ernährung eine Fettleber entwickeln kann, wobei an der Pathogenese der NASH v. a. gesättigte Fettsäuren beteiligt zu sein scheinen. Eine Untersuchung am Menschen ergab, dass der Anteil an gesättigten Fetten an der Nahrung von übergewichtigen NASH-Patienten höher ist als bei Probanden mit vergleichbarem Alter und BMI; außerdem konnten bei den NASH-Patienten erhöhte postprandiale Triglycerid-Werte festgestellt werden (Musso et al. 2003). Aber nicht nur ein hoher Fettanteil an der Nahrung, sondern auch eine übermäßige Zufuhr an Kohlenhydraten führt zu einer Leberverfettung, indem Glucose in den Hepatozyten die de novo Lipogenese stimuliert. Abgesehen davon, dass mit der Nahrung aufgenommene Fette unmittelbar von den Hepatozyten aufgenommen werden können, führt eine sehr Fett- und auch Kohlenhydrat-reiche Ernährung zur Entstehung von Adipositas und in deren Folge zur Insulinresistenz, unter deren Einfluss eine gesteigerte Lipolyse im Fettgewebe mit nachfolgendem Angebot an zirkulierenden freien Fettsäuren stattfindet (Byrne et al. 2009).

2.1.1.2 Insulinresistenz: gesteigerte Lipolyse im Fettgewebe

Der weitaus größte Anteil an hepatozytären Lipidspeichern im Rahmen der Fettleber stammt mit einem Prozentsatz von ca. 60 % aus von dem Fettgewebe freigesetzten Fettsäuren, die im Rahmen einer gesteigerten Lipolyse anfallen (Donnelly et al. 2005). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass der primäre Ausgangspunkt für die Leberzellverfettung im Fettgewebe zu suchen ist. Der pathogenetische Ansatzpunkt liegt hierbei in der hohen Koinzidenz der Fettlebererkrankungen mit dem Metabolischen Syndrom und v.a. dessen Komponente Insulinresistenz. Der Leberfettanteil ist signifikant erhöht bei Patienten mit Metabolischem Syndrom (Kotronen et al. 2007); außerdem korreliert das Ausmaß der Insulinresistenz mit dem Schweregrad der Steatose (Angelico et al. 2005). Insulin hat allgemein einen anabolen Effekt, d. h. Insulin sorgt für eine Speicherung von „überschüssigen“ Energieäquivalenten. So steigert Insulin die Aufnahme von Glucose in Fettzellen und Muskelzellen durch Aktivierung der Translokation des Glucose-Transporters GLUT-4 in die Zellmembran und fördert deren Abbau zu Pyruvat im Rahmen der Glycolyse, das in den Citrat-Zyklus eingeschleust wird, sodass Acetyl-CoA entsteht. Das entstandene Acetyl-CoA dient dann als Substrat für die Bildung von Fettsäuren, die in den Adipozyten mit Glycerinresten verestert werden und schließlich als Triglyceride im Fettgewebe gespeichert werden können (Qureshi et al. 2007). Neben dieser Steuerung des Aufbaus von Triglyceriden hemmt Insulin außerdem die Lipolyse im Fettgewebe, indem Insulin die Aktivität der Hormon-sensitiven Lipase (HSL) und damit die Hydrolyse von Triglyceride in Fettsäuren und Glycerin hemmt. Daneben steigert Insulin postprandial die Aufnahme von Fettsäuren in die Adipozyten durch eine Aktivierung der Lipoprotein-Lipase (LPL), die die in Chylomikronen und VLDL's gespeicherten Triglyceride hydrolysiert und somit deren Aufnahme und Speicherung im Fettgewebe fördert (Yu et al 2005). Im Rahmen einer bestehenden Insulinresistenz jedoch, wenn also das durchaus vorhandene bzw. sogar gesteigerte Insulin seinen Effekt nicht mehr ausüben kann, verliert Insulin seinen anabolen Effekt, und katabole, lipolytische Hormone wie die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin aber auch Natriuretische Peptide (Langin 2006) überwiegen. Fettzellen sind mit β_1 - und β_2 -Rezeptoren ausgestattet, bei deren Stimulation durch Katecholamine es zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration kommt. Das entstandene cAMP aktiviert die Proteinkinase A, die die Hormon-sensitive Lipase phosphoryliert und somit aktiviert (Langin 2006), was als Netto-Effekt zu einer verstärkten Lipolyse und damit Freisetzung von freien

Fettsäuren führt. Von pathogenetischer Bedeutung ist hierbei vor allem viszerales Fett. Studien, die den Zusammenhang der Körper-Fett-Verteilung mit hepatischer Fetteinlagerung untersuchten, konnten einen starken unabhängigen Zusammenhang zwischen der Menge an viszeralem Fett und einfacher hepatischer Steatose (Park et al. 2008) aber auch NASH (van der Porten et al. 2008) zeigen. In vitro Untersuchungen zum Einfluss von katecholaminergen lipolytischen Substanzen ergaben einen 2-fach erhöhten Anstieg der Glycerol-Produktion durch viszerale Adipozyten bei Stimulation zur Lipolyse bei Patienten mit hepatischer Fetteinlagerung; in dieser Patientengruppe konnte durch Noradrenalin-Stimulation eine 2-fach erhöhte Freisetzung von freien Fettsäuren aus viszeralen Adipozyten erzielt werden. Im Gegensatz dazu konnte in subcutanen Adipozyten kein Zusammenhang zwischen dem Leberfett-Gehalt und der Glycerol-Produktion und Freisetzung von freien Fettsäuren festgestellt werden (Thörne et al. 2010). Abgesehen von dieser fehlenden Hemmung der HSL durch Insulin im Rahmen der Insulinresistenz fehlt in gleichem Maße die Aktivierung der LPL, sodass die überschüssigen Plasma-Lipide nicht vom Fettgewebe aufgenommen werden und in der Folge in Nicht-Fettgewebe akkumulieren, d. h. vor allem im Muskelgewebe und in der Leber, wo sie zur Einlagerung von Triglyceriden in die Hepatozyten und letzten Endes zur Steatose führen. In den Muskelzellen verstärken die aufgenommenen Fettsäuren die Entstehung einer Insulinresistenz, die wiederum die Ansprechbarkeit des Fettgewebes auf Insulin weiter vermindern kann, sodass ein *circulus vitiosus* entsteht (Yu et al. 2005)

2.1.1.3 Gesteigerte de novo Lipogenese

Ein weiterer wichtiger Faktor in der Pathogenese der Steatose ist die hepatische Neubildung von Fettsäuren, also die de novo Lipogenese (DNL). Während unter normalen Bedingungen, also bei gesunden Personen, der Anteil an in der Leber neu gebildeten Triglyceriden an den durch VLDL's aus der Leber exportierten Triglyceriden bei ca. 5 % liegt, weisen Patienten mit einer Fettleber einen Anteil von ca. 15 % auf (Diraison et al. 2003). Donnelly et al. fanden in ihren Untersuchungen sogar einen Anteil von ca. 23 % an aus der hepatischen Triglycerid-Neubildung stammenden VLDL-Triglyceriden bei Fettleberpatienten heraus; auch deren hepatozellulär gespeicherte Triglyceride stammten zu etwa einem Viertel (26 %) aus direkt vor Ort, also in der Leber neu aufgebauten Fettsäuren (Donnelly et al. 2005). Gesunde Personen können postprandial ihre DNL steigern, wodurch bei ihnen der Anteil an DNL-Triglyceriden an der VLDL-Triglyceriden nach Nahrungsaufnahme von 5 % auf ca. 23 % gesteigert werden kann (Timlin et al. 2005). Bei Patienten mit einer Fettleber jedoch ist die

DNL-Rate konstant erhöht, d. h. auch im nüchternen Zustand, und kann nach Nahrungsaufnahme nicht mehr wesentlich gesteigert werden (Donnelly et al. 2005). Eine zentrale Rolle dabei spielen die Transkriptionsfaktoren Sterol responsive binding protein-1c (SREBP-1c), Carbohydrate response binding protein (ChREBP) und der Peroxisome proliferators activated receptor gamma (PPAR γ) (Cheung et al 2008).

2.1.1.4 Gestörte intrahepatische Lipid-Oxidation

Als weiterer Faktor der Steatose-Entstehung wird eine gestörte Lipid-Oxidation, d. h. ein nicht adäquater Abbau von Fettsäuren und Triglyceriden gehandelt (Larter et al. 2010, Cheung et al. 2008, Kallwitz et al. 2008). Die Oxidation von Fettsäuren erfolgt in drei Zellkompartimenten: die β -Oxidation läuft in den Mitochondrien und Peroxisomen ab, während die CYP4A-vermittelte ω -Oxidation in Mikrosomen des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist (Reddy et al. 2001). Es scheint hierbei v.a. ein intaktes und effektives peroxisomales Oxidationssystem nötig zu sein, um toxische Substanzen aus dem Lipidabbau abzufangen und der hepatischen Fetteinlagerung entgegenwirken zu können (Cheung et al. 2008). Bei Mäusen führen Defekte in den Schlüsselenzymen für die peroxisomale β -Oxidation zu hochgradiger mikroversikulären Steatose und Steatohepatitis mit erhöhten Serumwerten von very long-chain Fettsäuren (Fan et al. 1998).

Dem Transkriptionsfaktor PPAR α kommt dabei wohl eine Schlüsselrolle zu: PPAR α fungiert als ein Lipid-Sensor in der Leber, erkennt einen Anstrom von Fettsäuren und kann darauf reagieren (Reddy et al. 2006), indem er die Transkription vieler Gene, die für Enzyme aller drei Oxidationswege kodieren, reguliert (Kallwitz et al. 2008). So führt ein Verlust des PPAR α -Gens bei Mäusen zur Fettlebererkrankung bei Fütterung einer Hoch-Fett-Diät (Lee et al. 1995). Außerdem vermindert die Verabreichung eines hochpotenten PPAR α -Agonisten die hepatischen Steatose bei Mäusen unter Fütterungen einer Methionin und Cholin defizienten Diät (Nagasawa et al. 2006). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass unter Zuständen eines erhöhten Zustroms freier Fettsäuren zur Leber eine Aktivierung von PPAR α der Einlagerung von Lipiden in die Leberzellen durch eine Steigerung des Fettsäurenkatabolismus entgegenwirkt.

2.1.1.5 Gestörter Lipid-Export

VLDL (very low density lipoproteins) gehören zur Gruppe der Lipoproteine. Sie bilden Aggregate und besitzen neben Lipiden, die ihren hydrophoben Kern bilden, spezifische

Proteine mit hydrophilen und hydrophoben Domänen, die als Apolipoproteine bezeichnet werden. Die hydrophoben Lipide können so im hydrophilen Milieu des Blutes transportiert werden. VLDL werden in der Leber gebildet, sie enthalten neben einem Cholesterinanteil von ca. 20 % vor allem Triglyceride. Ihr zugehöriges Apolipoprotein ist ApoB-100. Nachdem die VLDL in den Hepatozyten mit Triglyceriden beladen worden sind, werden diese Komplexe in die Blutzirkulation abgegeben, wo sie ApoC-II aufnehmen, das an den Endothelzellen der Kapillaren die Hydrolyse der enthaltenen Triglyceride durch die Lipoproteinlipase vermittelt. Auf diese Weise werden VLDL über IDL (intermediate density lipoproteins) in LDL (low density lipoproteins) abgebaut. Die Aufgabe der VLDL ist somit die Verteilung der in der Leber aufgenommenen Lipide an die peripheren Gewebe (Rassow et al. 2006). Damit liegt nahe, dass ein gestörter Lipid-Export durch VLDL an der Entwicklung der Fettlebererkrankung beteiligt sein kann (Larter et al. 2010). So ist die relative Syntheserate von ApoB-100, dem Geschwindigkeit-bestimmenden Schritt an der VLDL-Synthese, bei adipösen NASH-Patienten im Vergleich zu einer schlanken Kontrollgruppe ohne NASH vermindert (Charlton et al. 2002). Auch in einem polygenetischen Mausmodell der NASH konnte eine verminderte VLDL-Synthese mit der hepatozytären Fettakkumulation in Verbindung gebracht werden. Eine gentechnisch induzierte Überexpression von MTP (microsomal transfer protein), dem Schlüsselenzym für die Beladung von ApoB mit Lipiden, resultierte in einer erhöhten VLDL-Produktion und konnte die Steatose und Insulinresistenz verbessern (Shido et al. 2010). Diese Ergebnisse konnten durch verschiedene Mausmodelle der NASH durch Zellkultur nachvollzogen werden, wobei hier die hepatozytäre Fettanreicherung mit einer verminderten Expression von ApoB und MTP verbunden war, was schließlich zu einem gestörten Lipid-Export durch VLDL führt (Henkel et al. 2012).

2.1.2 Second hit: Inflammation und Steatohepatitis

Aus Querschnittsstudien und Studien über den natürlichen Verlauf der Fettlebererkrankung kann abgeleitet werden, dass nur ein Teil der Patienten den Weg von der einfachen Steatose zu der aggressiveren Verlaufsform mit Inflammation, der Steatohepatitis, mit nachfolgender Aktivierung einer Fibrose und letztlich Zirrhose sowie möglicherweise Hepatozelluläres Karzinom einschlägt (Day 2006). Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die zu dieser Progression führen, ist nötig, zum einen um die Patienten herausfiltern zu können, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines aggressiveren Krankheitsverlauf haben, und andererseits um diesen Patienten bessere Therapien anbieten zu können. Im Folgenden werden mögliche „second hits“ vorgestellt, die auf dem Boden einer Steatose, dem „first hit“, eine hepatische Entzündungsreaktion auslösen bzw. verstärken können.

2.1.2.1 TNF α und andere Zytokine

TNF α

Von all den Zytokinen, die mit der Entstehung der NASH in Verbindung gebracht wurden und werden, hat TNF α die größte Aufmerksamkeit erlangt. TNF α gehört zur TNF(Tumor Necrosis Factor)-Superfamilie. Dies ist eine Gruppe von ca. 20 verschiedenen Proteinen, deren Signaltransduktion über die TNF-Rezeptoren Typ 1 und 2 abläuft, wodurch schließlich u. a. der nukleäre Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert wird (Rassow et al. 2006), der auch durch andere Mechanismen wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aktiviert werden und so eine Entzündungsreaktion auslösen kann (Lalor et al. 2007). TNF α reguliert das Überleben bzw. die Apoptose von Zellen und die Immunantwort und ist ein Mediator von Entzündungsreaktionen, indem er Immunzellen aktiviert und sie zum Entzündungsherd rekrutiert (Rassow et al. 2006).

Erhöhte Serumwerte von TNF α konnten sowohl bei der alkoholischen (ASH), als auch der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) festgestellt werden (Lalor et al. 2007). Bei der NASH sind erhöhte mRNA-Werte von TNF α in der Leber, wie auch im weißen Fettgewebe messbar. Die Expression war zudem bei Patienten mit NASH signifikant höher als bei denen mit einer einfachen Steatose ohne Inflammation (Crespo et al. 2001). Dabei scheint in der Leber eine gesteigerte TNF α -Sekretion vor allem von Kupffer-Zellen und infiltrierenden Monozyten und Makrophagen auszugehen (Diehl et al. 2005, Tilg et al. 2000). Auch die Werte für den löslichen TNF α -Rezeptor sind bei der Steatohepatitis erhöht (Abiru et al.

2006) und zirkulierende Monozyten von Patienten mit NASH zeigen nach Stimulation erhöhte TNF α -Sekretion im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Poniachik et al. 2006). Die pathogenetische Rolle von TNF α wird durch Beobachtungen unterstrichen, dass TNF-Rezeptor-Knockout-Mäuse, also Tiere, die durch gentechnische Manipulation keinen Rezeptor für TNF α exprimieren, bei Fütterung einer Methionin-Cholin-defizienten Diät eine abgeschwächte Entwicklung einer hepatischen Steatose sowie Fibrosierungsreaktion gegenüber ihren Wildtyp-Kontrollen zeigen, die den Rezeptor exprimieren (Tomita et al. 2006). Neben einer Erniedrigung der hepatischen Expression von TNF α war außerdem die Anzahl der aktivierten hepatischen Kupffer-Zellen erniedrigt, was einen Hinweis darauf gibt, dass diese sowohl TNF α sekretieren als auch sich gegenseitig durch TNF α autokrin bzw. parakrin stimulieren können. Schließlich konnte bei den Rezeptor-negativen Tieren eine abgeschwächte Aktivierung hepatischer Sternzellen beobachtet werden, die die hepatische Fibrose vermitteln, indem sie einen Myofibroblasten- und somit Bindegewebszell-ähnlichen Phänotyp einnehmen und so den Aufbau interzellulärer Matrix und die Fibrosierung regulieren (Lalor 2007). Analog resultiert eine Anti-TNF α -Behandlung mittels Pentoxifyllin in einer signifikanten Abschwächung der Leberschädigung bei Steatohepatitis (Koppe et al. 2004, Satapathy et al. 2004, Adams et al. 2004).

Adipozyten, besonders im viszeralen Fettgewebe, haben die Fähigkeit, große Mengen an TNF α auszuschütten. Dies stellt eine direkte Verbindung her zwischen chronischer Inflammation, wie es bei der NASH der Fall ist, und Adipositas, wie weiter oben erwähnt zusammen mit der Insulinresistenz ein wichtiger pathogenetischer Faktor der NASH (Tilg et al. 2000). Patienten zeigten nach einer Gewichtsabnahme eine verminderte Expression von TNF α , wobei sowohl TNF α , als auch sein löslicher Rezeptor positiv mit dem Body-Mass-Index korrelieren. Auch resultierte im Mausmodell das Fehlen bzw. die Neutralisation von TNF α in einer verminderten Insulinresistenz. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Adipositas, Insulinresistenz und NASH inflammatorische Zustände darstellen mit TNF α als gemeinsame Verbindung (Tilg et al. 2010). TNF α induziert in der Leber die Expression von IL-6, ein weiteres Zytokin, das einerseits eine Insulinresistenz verstärken kann und andererseits Inflamationsprozesse fördert. Auch IL-6 ist bei der NASH erhöht (Lalor et al. 2007). Desweiteren stimuliert TNF α in Endothelzellen die Ausbildung spezifischer Adhäsionsmoleküle zur Einwanderung von Lymphozyten, sodass eine erhöhte lokale TNF α -

Konzentration zu einem Entzündungszellinfiltrat führt und so maßgeblich am Fortschreiten hin zur Steatohepatitis beteiligt ist (Fox-Robichaud et al. 2000).

Die Synthese von Zytokinen wie TNF α und IL-6, der zwei Prototypen der proinflammatorischen Zytokine, ist eines der frühesten Ereignisse im Rahmen vieler Arten des Leberschadens, da diese die Produktion anderer Zytokine triggern und zusammen mit diesen Entzündungszellen anlocken und in der Leber einen Heilungsprozess anstoßen, der in der Leber als Fibrosierung abläuft. Als Antwort auf die Inflammation werden Hepatische Sternzellen stimuliert, extrazelluläre Matrix aufzubauen (Tilg 2010). TNF α kann über den TNF-Rezeptoren Typ 1 an Hepatische Sternzellen binden, so deren Proliferation stimulieren und dadurch eine Fibrosierungsreaktion auslösen (Tarrats et al. 2012).

Adiponectin

Als weiter wichtiger Faktor für die Entwicklung der NASH wird eine gestörte Balance zwischen TNF α und Adiponectin angenommen (Hui et al. 2004). Adiponectin ist ein 28 kDa großes Protein, das größtenteils im Fettgewebe synthetisiert wird und erstmals 1995 beschrieben wurde (Scherer et al. 1995). Die Wirkung von Adiponectin wird durch zwei Rezeptoren vermittelt, AdipoR2 und AdipoR1, die neben der Skelettmuskulatur auch in der Leber auf Hepatozyten exprimiert werden (Marra et al. 2011). Arita et al. konnten als erstes anhand verschiedener Patientengruppen zeigen, dass die Serum-Werte von Adiponectin bei Adipositas und Insulinresistenz niedriger sind als beim Gesunden (Arita et al. 1999). Diese Entdeckung schien anfangs sehr paradox, da die Serum-Werte der anderen bis dahin bekannten Adipozytokine, allen voran Leptin, in Zusammenhang mit Adipositas erhöht waren und in einer positiven Korrelation mit dem BMI standen, wohingegen Adiponectin negativ mit diesem korreliert ist. In gleicher Weise führte eine Gewichtsabnahme im Rahmen einer klinischen Studie zu steigenden zirkulierenden Adiponectin-Werten (Hotta et al. 2000). Adiponectin wirkt anti-inflammatorisch und kann als eine Art Gegenspieler des oben beschriebenen TNF α angesehen werden. TNF α unterdrückt die Transkription von Adiponectin in Adipozyten, was die verminderte Expression im Fettgewebe bei Adipositas erklären kann. Andererseits vermag auch Adiponectin den pro-inflammatorischen TNF α negativ zu regulieren: Adiponectin-Knockout-Mäuse zeigten hohe Werte von TNF α -mRNA im Fettgewebe, die jedoch nach Substitution von Adiponectin auf normale Werte zurück fielen (Maeda et al. 2002). Neben TNF α nimmt Adiponectin auch auf andere

Entzündungsmediatoren Einfluss. So kann es die anti-inflammatorisch wirkenden IL-10 und Interleukin-1-Rezeptor Antagonisten induzieren und pro-inflammatorische Faktoren wie IL-6 und NF κ B supprimieren (Tilg 2010).

Die Verminderung der anti-inflammatorischen Komponente durch einen relativen Adiponectin-Mangel scheint auch bei der NASH eine Rolle zu spielen. In einer klinischen Studie von Kaser et al. war die Adiponectin- und AdipoR2-mRNA-Expression in Leberbiopsien von Patienten mit NASH gegenüber Patienten mit einfacher Steatose signifikant reduziert. Bei den NASH-Patienten war die AdipoR2-mRNA-Expression invers mit den Transaminasen und dem Fibrosegrad korreliert (Kaser et al. 2005). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Plasma-Werte von Adiponectin bei NASH-Patienten erniedrigt waren, und zwar unabhängig von der Anwesenheit einer Adipositas (Gastaldelli et al. 2010). Adiponectin kann darüber hinaus im Tierexperiment die Fettleber günstig beeinflussen, und zwar sowohl die alkoholische, als auch die nicht-alkoholische Form: die Verabreichung von Adiponectin an Mäuse mit alkoholischer Fettlebererkrankung milderte die Hepatomegalie und die Steatose und konnte vor allem auch die hepatische Inflammation und die erhöhten Transaminasen, sowie die hepatische TNF α -Expression und dessen Plasmakonzentration abschwächen. Ebenso konnte Adiponectin im NASH-Tiermodell bei ob/ob-Mäusen die Hepatomegalie, Steatose und Transaminasen verbessern (Xu et al 2003). Aus diesen Ergebnissen kann man folgern, dass Adiponectin nicht nur auf Erkrankungen einen Einfluss hat, die mit Adipositas und Insulinresistenz einhergehen, wie der NASH, sondern auch auf die alkoholische Fettleber, einer Erkrankung, bei der die hepatische Fettinfiltration zwar offensichtlich ist, eine Insulinresistenz aber kein typisches Merkmal ist. Unter einer Hoch-Fett und Cholesterol-reichen Diät, unter der Ratten eine hepatische Inflammation und Fibrose entwickelten, war die Expression von AdipoR2 in der Leber vermindert (Matsunami et al. 2010) und die Fütterung von Hoch-Fett-Diät resultierte bei Adiponectin-Knockout-Mäusen in einer stärkeren perizellulären Fibrose als bei Wildtyp-Mäusen (Asano et al. 2009). Außerdem exazerbiert eine Adiponectin-Defizienz eine durch Carbontetrachlorid (CCl $_4$) induzierte Fibrose bei Mäusen. In vitro unterdrückt Adiponectin die Proliferation Hepatischer Sternzellen und vermindert die Genexpression von TGF- β 1, einem der wichtigsten pro-fibrogenen Zytokinen im Rahmen der Leberschadens durch Viren, NASH und Alkohol (Kamada et al. 2003). Somit gibt es zahlreiche Studien, die auf eine anti-inflammatorische und anti-fibrogene Wirkung von Adiponectin auf den Verlauf entzündlicher

Lebererkrankungen einschließlich der NASH hinweisen. Ist die Balance zu pro-inflammatorischen Faktoren wie $\text{TNF}\alpha$ gestört, kann dies ein möglicher Mechanismus dafür sein, dass die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung eine kompliziertere Verlaufsform mit Inflammation und Fibrose einnimmt.

2.1.2.2 Oxidativer Stress

Neben einem gestörten, pro-inflammatorischen Zytokinprofil geht man davon aus, dass auch vermehrter oxidativer Stress wesentlich an der Progression der NASH beteiligt ist (McCullough 2006). Dieser oxidative Stress entsteht durch eine Dysbalance zwischen Pro-Oxidanzien, wobei es sich hier v. a. um reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) handelt, und Anti-Oxidanzien in der Zelle (Rolo et al. 2012). Sowohl in Tierversuchen, als auch beim Menschen konnte im Rahmen der Fettlebererkrankung ein vermehrter oxidativer Stress nachgewiesen werden, der zusätzlich verstärkt ist bei Patienten mit NASH im Vergleich zu Patienten mit einfacher Steatose (McCullough 2006). Die Quelle dieses oxidativen Stresses sind wohl freie Fettsäuren (ffA), die die Leber im Rahmen der Insulinresistenz und einer damit einhergehenden gesteigerten Lipolyse und De-novo-Lipogenese, sowie durch eine vermehrte Aufnahme durch die Nahrung überschwemmen. Diese freien Fettsäuren können in der Leber in Triglyceride eingebaut werden. Hierbei geht man mittlerweile von einem eher protektiven Vorgang aus, da die reaktiven freien Fettsäuren durch eben diesen Einbau in Triglyceride neutralisiert werden (Farrell et al. 2012). Ist der Lipidspeicher jedoch überladen, fungieren die freien Fettsäuren als Liganden von $\text{PPAR}\alpha$, sodass die Oxidation von Fettsäuren in allen drei Kompartimenten, d. h. in den Mitochondrien, Peroxisomen und Microsomen, hochreguliert wird, in denen dann als Abbauprodukt vermehrt reaktive Sauerstoffspezies entstehen (McCullough 2006). Diese wiederum sind in der Lage, andere Lipide anzugreifen. So entstehen Aldehyd-Nebenprodukte, die sich durch eine verlängerte Halbwertszeit und eine bessere Diffusionsfähigkeit in der Zelle auszeichnen im Gegensatz zu den einfacheren ROS wie Wasserstoffperoxid und Superoxide. Auf diese Weise wird der oxidative Stress zusätzlich verstärkt (Rolo et al. 2012).

Vor allem den Mitochondrien wird hierbei ein großer Anteil an der NASH-Progression zugeschrieben. Sowohl bei NASH-Patienten, als auch in NASH-Tiermodellen konnten Veränderungen der mitochondrialen Morphologie in Form von Megamitochondrien und

anderen Auffälligkeiten (McCullough 2006), ein gestörter mitochondrialer Stoffwechsel mit verminderter ATP-Produktion und ein gesteigertes Anfallen von Lipid-Peroxiden gezeigt werden (Rolo et al. 2012).

Marker der Lipid-Peroxidation und des oxidativen DNA-Schadens wie der hepatische Gehalt an Hydroxynonenal und 8-Hydroxydeoxyguanosin korrelieren mit dem Schweregrad der Nekroinflammation und Fibrose bei NASH (Seki et al. 2002, Yesilova et al. 2005). Ebenso geht eine Schwächung der anti-oxidativen Systeme wie eine Verminderung der anti-oxidativen Faktoren Coenzym-Q10, Cu-Zn-Superoxid-Dismutase, Glutathion sowie eine reduzierte Catalase- und Glutathion-S-Transferase-Aktivität mit einer schwereren Ausprägung der Lebererkrankung einher (Rolo et al. 2012). Oxidativer Stress und ROS stimulieren Kupffer-Zellen zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$ und IL-6, die durch ihren chemotaktischen Effekt eine neutrophile Infiltration mit nachfolgender hepatischer Inflammation und so den in der NASH ablaufenden Leberzellschaden triggern (Reddy et al. 2006, Rolo et al. 2012). Außerdem konnte im Rahmen der NASH gezeigt werden, dass ROS direkt Hepatische Sternzellen aktivieren können (Guimaraes et al. 2006). So können ROS die Expression von α -SMA, Typ-I-Kollagen und MMP-2 durch Hepatische Sternzellen induzieren (Bian et al. 2012). Andererseits wirkt auch $\text{TNF}\alpha$ schädigend auf die mitochondriale Atmungskette ein, sodass wiederum ein *circulus vitiosus* entsteht (McCullough et al. 2006).

2.1.2.3 Weitere mögliche Mechanismen

Analog zu Tilg und Moschens Hypothese der „multiple parallel hits“ Hypothese (Tilg et Moschen 2010) sind noch weitere andere Mechanismen bekannt, die möglicherweise als Ursachen von Inflammation und Leberzellschaden im Rahmen der NASH in Frage kommen. Eine Auswahl aus diesen wird im Folgenden kurz zusammengefasst.

Lipotoxizität

Während die hepatozelluläre Speicherung von Lipiden in Form von Triglyceriden mittlerweile als eher kompensatorischer bzw. protektiver Mechanismus angesehen wird, werden v. a. Nicht-Triglycerid-Lipide wie freies Cholesterol und freie Fettsäuren mit der Lipotoxizität in Verbindung gebracht (Neuschwander-Tetri 2010). Freies Cholesterol akkumuliert im Unterschied zu anderen Lipiden selektiv in NASH-Lebern, nicht aber in Fettlebern ohne NASH, also ohne Inflammation und Fibrose. Von den freien Fettsäuren gelten besonders

langkettige gesättigte Fettsäuren wie Stearinsäure (C18) und Palmitinsäure (C16) als lipotoxisch im Vergleich zu einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Verantwortlich für die zytotoxischen Eigenschaften gilt das Potential dieser Moleküle, hepatozytäre Zelllinien zu töten, indem sie die Fähigkeit besitzen, direkt oder indirekt JNK zu aktivieren und den mitochondrialen und lysosomalen Zelltod-Signalweg auszulösen. Außerdem können sie pro-inflammatorische Signalwege über NFκB und JNK stimulieren (Farrell et al. 2012).

Endotoxine

Als weiterer pathogenetischer Faktor werden Endotoxine, im speziellen Lipopolysaccharid (LPS), gehandelt. LPS stammt aus den Zellwänden von gram-negativen Darmbakterien und spielt eine Rolle in der Entstehung von Leber-Entzündung und –Fibrose. Die Exposition mit LPS führt zu hepatischer Entzündung, Leberzellschaden und hepatischer Fibrose. Eine gesteigerte Darm-Permeabilität für Endotoxine und Bakterienbestandteile sowie erhöhte LPS-Werte konnten sowohl bei Patienten mit alkoholischer, als auch mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis nachgewiesen werden (Ilan 2012). Die von den bakteriellen Endotoxinen ausgelöste Entzündungsreaktion wird dabei über Toll-like-Rezeptoren vermittelt, insbesondere TLR-4, wobei durch deren Aktivierung multiple intrazelluläre Signalwege stimuliert werden, die inflammatorische und fibrogene Signale in der Leber verstärken und aufrechterhalten können (Bian et al. 2012). TLR's werden von Immunzellen, Kupffer-Zellen und Hepatischen Sternzellen exprimiert (Ilan 2012). Dadurch wird nach Bindung von LPS eine intrahepatische Entzündungsreaktion initiiert und Hepatische Sternzellen zur Proliferation und Kollagen-Produktion stimuliert (Bian et al. 2012). Verstärkt wird dieser Mechanismus durch die Tatsache, dass LPS und bakterielle Bestandteile über die Portalvene direkt aus dem Darm in die Leber gelangen, sodass die Leber diesen schädlichen Verbindungen ständig exponiert ist (Ilan 2012).

Angeborene Immunität

Die Leber stellt ein wichtiges Organ der angeborenen Immunabwehr mit einer großen Menge von Zellen des angeborenen Immunsystems dar. Von diesen wird eine besondere Rolle den Kupffer-Zellen, Gewebsmakrophagen der Leber, den natural-killer(NK)-Zellen und den natural-killer-T(NKT)-Zellen beigemessen (Zhan et An 2010). Es wird angenommen, dass dabei eine Imbalance pro- und anti-inflammatorischer Zytokine mit einem Exzess pro-inflammatorischer Th1-Zytokine wie TNFα, IL-6 und IL-12 gegenüber anti-inflammatorischen

Th2-Zytokinen wie IL-4 und IL-10 als gemeinsamer zugrundeliegender pathogenetischer Mechanismus von hepatischer Insulinresistenz und Progression der NASH wirkt (Li et Diehl 2003). Diese Zellen können sowohl durch Fettsäuren aus der Nahrung und dem Fettgewebe sowie intestinalen Bakterien durch deren Bindung an Toll-like-Rezeptoren aktiviert werden, sowie durch aus dem Fettgewebe stammende Zytokine wie weiter oben bereits beschrieben. Ebenso können sie ihre Aktivität gegenseitig über eine lokale Zytokinproduktion regulieren (Zhan et An 2010).

Den Kupffer-Zellen wird am ehesten eine pro-inflammatorische Funktion zugeschrieben. Diese halten sich in den Leber-Sinusoiden auf. Sie sind Quelle verschiedener Mediatoren wie pro-inflammatorischer Zytokine und ROS, was die Kupffer-Zellen wiederum mit dem Faktor „oxidativer Stress“ verbindet, und erzeugen so sowohl eine lokale, als auch systemische Immunantwort, die zu einem hepatozytären Zellschaden führt. Dass Kupffer-Zellen auch bei der NASH eine wichtige Rolle zu spielen scheinen, konnte ein NASH-Tiermodell an Ratten mit Hoch-Fett-Diät zeigen, bei dem eine hochgradige Rekrutierung und Aktivierung von Kupffer-Zellen nachgewiesen werden konnte (Zhan et An 2010). Im NASH-Mausmodell unter MCD-Diät resultierte eine Depletion der Kupffer-Zellen in einer Milderung des histologischen Bildes der Steatohepatitis (Rivera et al. 2007).

2.2 Die Rolle des Sympathischen Nervensystems (SNS)

2.2.1 Anatomie der autonomen Leberinnervation

Die Leber wird sowohl von sympathischen, als auch von parasympathischen Nerven innerviert, wobei beide Teile des autonomen Nervensystems efferente und afferente Fasern enthalten (Yi et al. 2010). So kann die Leber metabolische Informationen sammeln und über afferente Fasern an das zentrale Nervensystem weitergeben. Dort werden die von der Leber gesammelten Informationen im Hypothalamus integriert und der Hypothalamus kann über efferente Fasern sowohl über den Sympathikus, als auch über den Parasympathikus auf den Metabolismus der Leber (Uyama et al. 2004) und hepatischen Blutfluss (Chida et al. 2006) Einfluss nehmen.

Die postsynaptischen sympathischen Fasern für die Leberinnervation entspringen hauptsächlich dem Ganglion coeliacum und teilweise dem Ganglion mesentericum superius. Die Zellkörper der präsynaptischen Neurone sind dabei in der intermediolateralen Säule des unteren Thorakalmarks (Th 7 – Th 12) lokalisiert (Yi et al. 2010). Das efferente sympathische System besteht neben dieser direkten nervalen Achse zwischen Hypothalamus, sympathischen Lebernerven und Norepinephrin (Synonym Noradrenalin) aus einer zweiten Achse zwischen Hypothalamus, Nebennierenmark und Epinephrin (Synonym Adrenalin). Auf dem zweiten Weg gelangt Adrenalin als sympathischer Neurotransmitter über den Blutweg zur Leber und stellt somit eine indirekte humorale Verbindung zwischen Hypothalamus und der Leber als sympathisches Erfolgsorgan über die Katecholamine dar (Chida et al. 2006). Wegen Noradrenalin als Neurotransmitter der postsynaptischen sympathischen Nervenfasern nennt man diese adrenerge bzw. aminerge Neurone.

Die parasympathischen Lebernerven gehen aus den präganglionären Neuronen des dorsalen motorischen Kern des Nervus vagus im dorsalen Hirnstamm hervor und verlaufen zusammen mit dem N. vagus bis zum Zielorgan, wo sie auf das zweite Neuron umgeschaltet werden. Anders als bei anderen viszerale Organen konnten jedoch in der Leber bisher keine parasympathischen Ganglien sicher identifiziert werden (Yi et al. 2010). Die Überträgersubstanz der postganglionären parasympathischen Neurone ist Acetylcholin, deshalb spricht man von cholinergen Neuronen.

Die autonomen Lebernerven treten am Leberhilus in das Organ ein und sind in ihrem Verlauf mit den Ästen von Portalvene, Leberarterie und Gallengang assoziiert. Analog machen sie jede Aufteilung in die Unteräste dieser drei Strukturen mit bis auf das Niveau der kleinsten Portalfelder (McCuskey 2004). Generell konnten bei den meisten untersuchten Spezies sympathische und parasympathische Marker in den Ästen der Leberarterien und in der Umgebung von Portalvenen- und Gallengangästen nachgewiesen werden. Als Marker für sympathische Efferente Fasern können hierbei Tyrosinhydroxylase und Neuropeptid Y verwendet werden (Yi et al. 2010). Während sich die Innervationssituation in den Portalfeldern zwischen den einzelnen Arten der Säugetiere im Großen und Ganzen stark angleicht, ist die Verteilung autonomer Nervenfasern innerhalb des Leberläppchen und somit die Innervation des Leberparenchyms sehr Spezies-abhängig. Obwohl die Dichte der sympathischen Nervenfasern periportal am größten ist, strahlen bei den meisten Säugetierarten – einschließlich dem Menschen – Nervenfasern in die Läppchen und dort in den Dissé-Raum ein, wo sie sich in naher Beziehung zu Hepatischen Sternzellen, Hepatozyten, Sinusendothelzellen und Kupffer-Zellen befinden (McCuskey 2004, Lin et al. 1995, Ding et al. 1991). Unter allen Säugetieren wiederum hat der Mensch die dichteste Ausprägung intralobulärer Nerven (Uyama et al. 2004). Mäuse und Ratten jedoch, die am häufigsten für Tiermodelle verwendet werden, zeigen keine intralobuläre Innervation. Bei diesen Arten sind die Fasern auf die Periportalfelder beschränkt (Akiyoshi et al. 1998, Fukuda et al. 1996, Lin et al. 1995). Diese Tatsache könnte per se einen Grund eingeschränkter Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierversuchen mit diesen Tierarten auf den Menschen darstellen. Trotzdem könnte die Funktionalität efferenter sympathischer Innervation von Spezies mit parenchymaler Nervenfaserverteilung mit jener von Arten ohne intralobuläre sympathische Innervation korrespondieren, da Informationen aminерger und peptiderger Nervenendigungen durch Zell-Zell-Kontakte wie gap-junctions auch elektrisch zwischen individuellen Zellen fortgeleitet werden können (Yi et al. 2010). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Entdeckung, dass offenbar eine inverse Relation zwischen dem Vorhandensein intralobulärer Nervenfasern und dem Ausmaß der Ausprägung von gap-junctions besteht. Außerdem konnte beobachtet werden, dass eine Inhibition von gap-junctions zu einer signifikanten Reduktion des durch Nervenstimulation erzielten Glucose-Outputs führte (McCuskey 2004). Ebenfalls vorstellbar ist, dass die metabolischen Effekte

durch Diffusion ausgeschütteter Neurotransmitter vermittelt werden oder indirekt durch eine Veränderung des Blutflusses durch das Leberläppchen (McCuskey 2004).

Im Gegensatz zur aminergen scheint die cholinerge Innervation nicht derart Spezies-abhängig zu sein. Cholinerge Nervenfasern beschränken sich auf den portalen Raum und angrenzende Hepatozyten, strahlen aber nicht in das intralobuläre Parenchym ein (McCuskey 2004).

Neben den klassischen Neurotransmittern Noradrenalin und Acetylcholin enthalten intrahepatische Nerven auch Neuropeptide wie Neuropeptid Y, Substanz P, CGRP, VIP u. a.. Es konnte gezeigt werden, dass einige neuropeptidergen Nerven mit adrenergen und cholinergie Nerven co-lokalisiert sind. Doppelte immunhistochemische Färbung von Neuropeptid Y (NPY) und Tyrosinhydroxylase (TH) ergab eine Überlappung von NPY- und TH-positiven Nervenfasern (Fehér et al. 1991). Systemische Verabreichung von 6-Hydroxydopamin führt zu einer offensichtlich kompletten Elimination sowohl TH- als auch NPY-positiver immunoreaktiver Fasern. Deshalb gelten NPY-enthaltende Fasern als Subpopulation sympathischer Nerven in der Leber (Uyama et al. 2004, Goehler et Sternini 1991).

2.2.2 Regulation des Energiemetabolismus durch das sympathische Nervensystem

Das autonome Nervensystem kann als zentraler Mediator den Metabolismus des Organismus regulieren und physiologische Reaktionen auf interne und externe Stimuli vermitteln. Sowohl funktionell, also auch wie oben beschrieben anatomisch ist es dabei in seine zwei Komponenten unterteilt: das sympathische und das parasympathische Nervensystem. Das parasympathische Nervensystem auf der einen Seite bewirkt anabole Effekte, ist also eher für die Speicherung von Energieäquivalenten verantwortlich. Dem gegenüber steht das sympathische Nervensystem, das mit seinen Hormonen bzw. Neurotransmittern Adrenalin und Noradrenalin für eine katabole Antwort sorgt und so Energie für Notfallsituationen bereitstellt. Es initiiert also die sogenannte evolutionstheoretisch hergeleitete „fight-or-flight“-Reaktion (Teff 2007). Neben einer zentralen Rolle des Sympathikus in der Regulation der Zirkulation hat er einen immensen Stellenwert in der Steuerung des Metabolismus inne, indem er die Funktionen wichtiger Stoffwechselorgane, allen voran der Leber, des Fettgewebes und des Pankreas beeinflusst. Außerdem ist das sympathische Nervensystem maßgeblich beteiligt an der Regulation aller

Mechanismen des täglichen Energiehaushaltes und steuert so den Grundumsatz in Ruhe, sowie den Energieumsatz bei physischer Aktivität und die Thermogenese (Lambert et al. 2010).

Mehr als jedes andere Organ ist die Leber an der Aufrechterhaltung eines metabolischen Gleichgewichts im Organismus beteiligt. Eine zentrale Rolle hat die Leber v. a. in der Regulation der Glucose-Homöostase. Je nach Versorgungszustand mit Nährstoffen kann die Leber von Netto-Glucose-Aufnahme auf Netto-Glucose-Abgabe umschalten. Außerdem hat die Leber eine Schlüsselrolle im Lipid-Metabolismus durch die Fähigkeit zur Synthese und Degradation von Lipoproteinen, die Konvertierung von Fettsäuren in Ketonkörper, die β -Oxidation und bei Nagern die Möglichkeit der Synthese von Fettsäuren aus Kohlenhydraten. Diese Stoffwechselwege stehen unter der Kontrolle von Stoffwechselmetaboliten, zirkulierenden Hormonen, von denen die wichtigsten Insulin, Glucagon und die Katecholamine Adrenalin aus dem Nebennierenmark und Noradrenalin darstellen, sowie den hepatischen autonomen Nerven (Püschel 2004). Das sympathische Nervensystem steigert die hepatische Glucoseproduktion durch vermehrte Glycogenolyse im gesättigten Zustand, wenn große Glycogen-Vorräte bestehen, und durch eine Aktivierung der Gluconeogenese in Hunger-Zeiten, in denen die Glycogen-Vorräte in der Leber aufgebraucht sind. Der hepatische Glucosemetabolismus steht unter direkter Kontrolle der autonomen Leberinnervation (Nonogaki 2000) und wird vermittelt durch eine Stimulierung von α_1 - und β_2 -Adrenorezeptoren in der Leber (Lambert et al. 2010). Die Tatsache jedoch, dass eine Unterbrechung der Leberinnervation, sei es chirurgisch im Rahmen einer Lebertransplantation oder pharmakologisch, zu keiner extremen Veränderung des metabolischen Gleichgewichts führt, relativiert die Wichtigkeit der direkten Leberinnervation. Gleichwohl die direkte nervale Kontrolle offensichtlich nur subtile Veränderungen im hepatischen Metabolismus bewirkt und somit eher für das „fine-tuning“ zuständig ist (Püschel 2004), hat das sympathische Nervensystem wohl indirekt einen stärkeren Einfluss. Eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems führt zur Ausschüttung von Adrenalin aus dem Nebennierenmark, das über den Blutweg zur Leber gelangt und dort die Glucoseproduktion steigert. Außerdem reguliert das autonome Nervensystem durch direkte Innervation die Ausschüttung der Pankreashormone (Nonogaki 2000).

Das Pankreas wird durch beide Schenkel des autonomen Nervensystems innerviert. Es lassen sich sympathische und parasympathische Nervenfasern in unmittelbarer Nachbarschaft zu den verschiedenen Arten von Inselzellen nachweisen (Nonogaki 2000). Die verantwortlichen Adrenozeptoren im Pankreas sind hierbei mit einem großen Stellenwert α_2 - und mit einem geringeren Effekt β_2 -Rezeptoren (Lambert et al. 2010). Die Stimulation von α_2 -Rezeptoren resultiert in einer gesteigerten Sekretion von Glucagon aus pankreatischen α -Zellen und einer Suppression der Insulin-Sekretion durch β -Zellen. Die Aktivierung von β_2 -Rezeptoren führt zu einer gesteigerten Ausschüttung von sowohl Glucagon, als auch Insulin, die Inhibition der Insulin-Sekretion durch α -Adrenozeptoren jedoch dominiert über die Stimulation durch β -Rezeptoren. Eine Aktivierung vagaler pankreatischer Nerven führt zur gesteigerten Insulin-Sekretion (Nonogaki 2000). So nimmt das sympathische Nervensystem durch die Hormone des Pankreas indirekt auf den hepatischen Glucosemetabolismus Einfluss, indem Insulin zu einer gesteigerten Aufnahme in die und Glucagon zur gesteigerten Freisetzung von Glucose aus der Leber führt.

Neben dem Metabolismus der Leber wird derjenige der Skelettmuskulatur durch direkte und indirekt Effekte des autonomen Nervensystems reguliert. Unter den verschiedenen Geweben gilt die Skelettmuskulatur als einer der Hauptverbraucher von Glucose. Dort wird Glucose im Wesentlichen Insulin-vermittelt aufgenommen. Es gibt jedoch auch Anhaltspunkte für die Existenz eines nicht Insulin-abhängigen Mechanismus der Glucose-Aufnahme, wobei dieser durch das sympathische Nervensystem in Form von Noradrenalin vermittelt wird. Als Antwort auf eine Sympathikus-Aktivierung, sei es durch körperliche Belastung, Kälte-Exposition oder zentralnervöse Stimulation sympathischer Zentren im Hypothalamus konnte in verschiedenen Studien eine gesteigerte Glucose-Aufnahme in die Muskelzellen nachgewiesen werden, trotz unveränderter bzw. sogar reduzierter Plasma-Insulin-Konzentrationen (Nonogaki 2000). Die Stimulation der Glucose-Aufnahme und eine gesteigerte Glycogenolyse wird in der Skelettmuskulatur über eine Aktivierung des β_2 -Rezeptors vermittelt (Lambert et al. 2010). In den Muskelzellen entsteht durch Glycogenolyse Glucose-6-Phosphat. Da im Gegensatz zu den Leberzellen Muskelzellen keine Glucose-6-Phosphatase exprimieren können, kann die entstandene Glucose nicht aus der Zelle ausgeschleust werden und ist somit nur lokal in der Muskelzelle verfügbar. Deshalb kann Glucose-6-Phosphat zu Lactat metabolisiert werden, das über den Blutweg zur Leber

gelangt und dort als Substrat für die Gluconeogenese dient (Nonogaki 2000). Somit ist der Metabolismus der Skelettmuskulatur eng an den Stoffwechsel der Leber gekoppelt.

Auch im weißen und braunen Fettgewebe spielt das sympathische Nervensystem eine große Rolle bei der Glucose-Aufnahme. Dieser Effekt wird Insulin-unabhängig v. a. durch die β -adrenerge Wirkung von Noradrenalin ausgeübt (Nonogaki 2000).

Neben dem Glucosemetabolismus haben die Catecholamine einen sehr bedeutenden Stellenwert im Lipid-Stoffwechsel des Fettgewebes. Während Insulin das wichtigste anti-lipolytische Hormon darstellt, sind Catecholamine die potentesten lipolytischen Mediatoren. Beim Menschen wird die Lipolyse über vier verschiedene Adrenorezeptoren reguliert. Alle drei β -Rezeptoren – β_1 , β_2 und β_3 – stimulieren die Hydrolyse von Triglyceriden, wobei die β_1 - und β_2 -Rezeptoren am aktivsten sind. Bei Nagern wird der größte Effekt durch den β_3 -Rezeptor ausgeübt (Arner 2005). Die größte Expression des β_3 -Rezeptors findet hierbei im weißen und braunen Fettgewebe statt und anders als die beiden anderen Typen von β -Rezeptoren ist der β_3 -Typ relativ spezifisch für das Fettgewebe. Selektive β_3 -Agonisten aktivieren bei Nagern die Lipolyse und Thermogenese und vermitteln so einen anti-adipösen und anti-diabetischen Effekt. Die Expression und der Beitrag zur Catecholamin-induzierten Lipolyse in menschlichen Adipozyten scheinen jedoch begrenzt zu sein (Langin 2006). Nach Bindung von Catecholaminen an β -Adrenorezeptoren, die mit G_s -Proteinen – einem stimulierenden G-Protein – gekoppelt sind, wird die Aktivität der Adenylatcyclase gesteigert. Dies führt zu einem Anstieg von cyclischem AMP (cAMP) intrazellulär, das wiederum die Proteinkinase A stimuliert. Diese ist in der Lage, die Hormonsensitive Lipase (HSL) zu phosphorylieren und somit zu aktivieren. Die HSL ist der wichtigste Geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Regulation der Lipolyse. Sie katalysiert die Hydrolyse von Triglyceriden zu Diacylglyceriden und weiter zu Monoacylglyceriden und ist das einzige Enzym im Stoffwechselweg der Lipolyse, das hormonell reguliert wird (Arner 2005, Langin 2006). Der vierte Typ der Adrenorezeptoren mit Expression im Fettgewebe ist der α_2 -Rezeptor. Die Bindung von Catecholaminen an α_2 -Rezeptoren übt einen anti-lipolytischen Effekt aus. Dieser Rezeptor ist mit einem inhibitorischen G_i -Protein gekoppelt, was über einen Abfall des intrazellulären cAMP schließlich zu einer verminderten Aktivität der HSL führt (Langin 2006). Die basale lipolytische Rate ist im subcutanen Fettgewebe höher als im visceralen Fettgewebe. Nach Stimulation durch Catecholamine jedoch kehrt sich dieses

Verhältnis um und es werden deutlich größere Mengen freier Fettsäuren aus den visceralen Fettdepots freigesetzt (Arner 2005). Gründe dafür könnten zum einen eine höhere Expression von α_2 -Rezeptoren auf subcutanen Adipozyten sein, sowie eine größere Empfindlichkeit von α_2 - gegenüber β -Rezeptoren auf Catecholamine (Langin 2006). Die aus dem visceralen Fettgewebe freigesetzten Fettsäuren gelangen über den portalen Blutfluss direkt zur Leber, können so die Leberfunktion stören, Dyslipidämie, Hyperinsulinämie und Glucose-Intoleranz verursachen (Arner 2005) und möglicherweise auch wesentlich an der hepatozytären Fetteinlagerung im Rahmen des „first hit“ der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung beteiligt sein.

2.2.3 Der mögliche Einfluss des SNS auf die Steatosis hepatis

Der Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die Entstehung der hepatozytären Fetteinlagerung im Rahmen der Fettlebererkrankungen konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden. So gibt es Studien, die in einer Sympathikusaktivierung einen pathogenetischen Mechanismus der Fettleberentstehung sehen, andere gehen eher von einem protektiven Effekt der Sympathikuswirkung aus. Diese beiden Sichtweisen sollen im Folgenden veranschaulicht werden.

Donnelly et al. konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass der Hauptteil der in der Fettleber akkumulierenden Lipide aus dem Fettgewebe stammt, wo Fettsäuren im Rahmen der Lipolyse freigesetzt werden, anschließend zur Leber strömen und dort in den Triglycerid-Pool eingebaut werden (Donnelly et al. 2005). Wie oben beschrieben, sind Catecholamine, die Effektorsubstanzen des sympathischen Nervensystems, sehr potente Aktivatoren der Lipolyse. Zudem ist bekannt, dass bei Adipositas, und hier v. a. bei zentraler Fettleibigkeit, Insulinresistenz und Metabolischem Syndrom – die Hauptrisikofaktoren der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (Park et al. 2008, Kotronen et al. 2007, Angelico et al. 2005) – ein gesteigerter Tonus des sympathischen Nervensystems vorliegt (Lambert et al. 2010, Grassi et al. 2004, Straznicky et al. 2005). Außerdem konnte an Adipozyten aus dem viszerale Fettgewebe von Probanden mit Stammfettsucht eine zweifach gesteigerte Noradrenalin-stimulierte Freisetzung von freien Fettsäuren und Glycerol im Vergleich zu schlanken Kontrollpersonen nachgewiesen werden (Lönngqvist et al. 1995). Schließlich kann aus der Arbeit von Thörne et al. weiterhin abgeleitet werden, dass eine gesteigerte Catecholamin-stimulierte Lipolyse im viszerale Fettgewebe eine Ursache erhöhten

Leberfett sein kann: die hepatische Fettakkumulation bei adipösen Frauen ist mit einer ausgeprägten Steigerung der lipolytischen Aktivität im viszeralen Fettgewebe korreliert. So war v. a. die Noradrenalin-vermittelte Freisetzung freier Fettsäuren aus viszeralen Adipozyten ca. doppelt so hoch bei den Patientinnen mit viel im Vergleich zu den Probandinnen mit wenig Leberfett. Für die lipolytische Aktivität subcutaner Adipozyten konnte keine positive Korrelation hergestellt werden, ebenfalls standen weder die absolute gesamte, noch viszerale und subcutane Fettmasse in einem positiven Zusammenhang mit einem erhöhten Leberfettanteil (Thörne et al. 2010). Zusammenfassend lässt sich also eine Kausalitätskette ausgehend von Adipositas und Metabolischem Syndrom, über eine damit einhergehende Aktivitätssteigerung des sympathischen Nervensystems und eine dadurch gesteigerte Lipolyse besonders im viszeralen Fettgewebe herstellen. Die direkte venöse Drainage viszeraler Adipozyten in das portale System wiederum führt zu einem gesteigerten Fluss freier Fettsäuren zur Leber, wo diese zur Leberzellverfettung und Steatosis hepatis beitragen. Dieser Mechanismus unterstützt also die Auffassung, dass ein gesteigerter Sympathikotonus zur Verschlechterung der Fettlebererkrankung führt.

Diese Steatose-fördernde Wirkung wird durch Versuche an alternden Nagern bekräftigt: diese entwickeln während des Alterns eine erhöhte hepatische Fetteinlagerung. Es konnte beobachtet werden, dass eine positive Korrelation zwischen dem Leberfett-Gehalt und der durch den β -Adrenoceptor-Agonisten Isoproterenol stimulierten Aktivität der Leber Adenylatcyclase besteht. In vivo führte die Verabreichung von Isoproterenol an junge und alte Nager und in vitro die Überexpression von β 1- und β 2-Adrenoceptoren auf Hepatozyten von jungen Tieren zu einer gesteigerten Fett-Akkumulation. Außerdem konnte der Fettgehalt von Hepatozyten alter Tiere durch den β 1- und β 2-selektiven Antagonisten Propranolol gesenkt werden. Dabei scheint die Isoproterenol-induzierte hepatische Fettakkumulation einen Leber-intrinsischen Mechanismus zu reflektieren, da Acipimox, ein Inhibitor der Lipolyse im Fettgewebe, die hepatischen Lipid-Level nicht beeinflussen konnte (Ghosh et al. 2012). Welche zellulären Mechanismen dahinter stecken, konnte durch diese Studie nicht beantwortet werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass diese adrenerg vermittelten Effekte durch einen verminderten Lipid-Export über VLDL verursacht sein könnten. An isolierten Ratten-Hepatozyten konnte gezeigt werden, dass sowohl Epinephrin, als auch der α -Agonist Phenylephrin und der β -Agonist Isoproterenol die VLDL-assoziierte Triglycerid-Sekretion unterdrücken und so den intrazellulären Triglycerid-Gehalt steigern können

(Rasouli et Zahraie 2006). In der perfundierten Rattenleber verursachten die sympathischen Neurotransmitter Noradrenalin und ATP sowie der α -Agonist Phenylephrin eine verminderte Sekretion von sowohl Triglyceriden als auch ApoB, dem Haupt-Apolipoprotein der VLDL (Yamauchi et al. 1998). Umgekehrt führte eine chemische Leberdenervierung mittels Phenol zu erhöhten Serum-Triglyceriden und -Cholesterol und zu einer gesteigerten mittleren Triglycerid-Sekretionsrate durch die Leber, vermutlich durch eine gesteigerte VLDL-Sekretion, ohne dass dabei jedoch der hepatische Lipid-Gehalt verändert war (Rasouli et al. 2012). Einen Hinweis auf die Steatose-fördernde Wirkung des sympathischen Nervensystems kann schließlich auch aus einem Modell der alkoholischen Steatohepatitis an Ratten abgeleitet werden: hier führte Carvedilol, ein Antagonist an β_1 -, β_2 - und α_1 -Rezeptoren, zu verminderten Triglycerideinlagerungen in der Leber, einer verminderten Expression der Fettsäure-Synthase und von SREBP-1, sowie zu einer Hoch-Regulierung von PPAR α (Liu et al. 2012).

Im Gegensatz hierzu soll nun die Auffassung beschrieben werden, dass eine Sympathikusaktivierung einen eher protektiven Mechanismus hinsichtlich der hepatischen Fetteinlagerung darstellt. Trotz eines gesteigerten sympathischen Grundtonus, gibt es auch Hinweise, dass bei Adipositas die sympathische Antwort auf physiologische Reize wie veränderte Zustände des Energiestoffwechsels, Nahrungsaufnahme, Glucose-Konsum, Hyperinsulinämie und Kälte-Exposition abgestumpft ist. Diese abgeschwächte sympathische Reaktion kann über eine defiziente Thermogenese und eine positive Energiebilanz zum Aufbau von Körpermasse beitragen (Lambert et al. 2010). Die Beobachtung, dass eine Schädigung des ventromedialen Hypothalamus bei Ratten die Aktivität des sympathischen Nervensystems reduziert und so zu Adipositas ohne Überernährung führt, bildete die Basis der Hypothese, dass v. a. eine reduzierte Sympathikus-vermittelte Thermogenese in Gewichtszunahme und Adipositas resultiert (Bray et al. 1989). Ein Einfluss auf die Fettleber-Entstehung konnte aus Versuchen mit β -Adrenorezeptor-knockout-Mäusen abgeleitet werden. Diese exprimieren einen adipösen Phänotyp und sind Kälte-intolerant. Eine spezifische Ausschaltung des β_1 -Rezeptors zusammen mit der Fütterung einer Hoch-Fett-Diät führt zu Adipositas, abgeschwächter Diät-induzierter Thermogenese, Nüchtern-Hyperglykämie, Glucose-Intoleranz sowie ausgeprägter nicht-alkoholischer Steatohepatitis (Ueta et al. 2012). Diese Experimente wurden an Nagern durchgeführt, die viel für die Thermogenese verantwortliches braunes Fettgewebe besitzen. Kürzlich durchgeführte

Studien konnten jedoch zeigen, dass entgegen der früheren Meinung auch erwachsene Menschen funktionelles braunes Fettgewebe exprimieren, wobei die Menge an braunem Fettgewebe in einer inversen Korrelation mit dem BMI steht (Cypess et al. 2009, Cypess et Kahn 2010). Abgesehen von dieser durch den Einfluss auf das Fettgewebe und den Energiestoffwechsel vermittelten Wirkung gibt es auch Untersuchungen, die auf einen direkten positiven Effekt sympathischer Effektoren auf den Lipidstoffwechsel in der Leber hinweisen. Epinephrin-defiziente Mäuse entwickeln eine ausgeprägte hepatische Steatose als Reaktion auf längeres Fasten, wobei dies vermutlich auf einer gestörten Lipid-Oxidation durch eine Störung des sog. „autophagy pathway“ beruht. Es handelt sich hierbei um einen alternativen Stoffwechselweg, der Fettsäuren in die β -Oxidation einschleusen kann, indem er als Antwort auf einen Nährstoffmangel alternative Energiequellen durch die Verdauung intrazellulärer Organellen und Energiespeicher, inklusive Lipide, zur Verfügung stellt (Sharara-Chami et al. 2012). Umgekehrt konnte in Zellkulturversuchen mit Hepatozyten durch Adrenorezeptor-Agonisten eine gesteigerte mitochondriale β -Oxidation von Fettsäuren erzielt werden. So steigerten Dopamin und Dobutamin β -Rezeptor-vermittelt die Expression der hepatischen Carnitin-Palmitoyl-Transferase (CPT), dem Geschwindigkeit-bestimmenden Schritt der hepatischen mitochondrialen β -Oxidation und Ketonkörper-Synthese, indem dieses Enzym die Aufnahme langkettiger Fettsäuren in die Mitochondrien katalysiert (Barke et al. 1993). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass eine Leber-Denervation an Ratten mittels Phenol die Aktivität von CPT I und II vermindert, was zu einem gesteigerten Einbau langkettiger Fettsäuren in den TG-Pool der Leberzellen sowie zu einem gesteigerten absoluten hepatischen Fettgehalt führte. Außerdem war auch die Aufnahme exogener Fettsäuren in die hepatisch sekretierten VLDL abgeschwächt (Carreño et Seelaender 2004). Die gleiche Gruppe konnte in einer weiteren Studie nach Leber-Denervation eine verminderte Sekretion von VLDL-TG und mRNA-Expression von CPT I und ApoB nachweisen, die Plasma-Konzentration von Cholesterol und das VLDL-Cholesterol hingegen waren erhöht (Tavares et Seelaender 2008). Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass nach Unterbrechung der sympathischen Leberinnervation sowohl die Oxidation, als auch der Export von Lipiden gestört ist, was möglicherweise zur Akkumulation von Fetten und Steatosis hepatis beitragen kann. Unterstützt wird diese Auffassung außerdem durch die Beobachtung im Rahmen der menschlichen Leberzirrhose, dass die Abwesenheit

Noradrenalin-immunoreaktiver Nervenfasern in der Leber mit einem erhöhten Fettgehalt in dem Organ assoziiert ist (Fukuda et al. 1996).

Zusammenfassend ist also hinsichtlich des Einflusses der sympathischen Leberinnervation bzw. von Catecholaminen auf die Fettleberentstehung festzuhalten, dass das sympathische Nervensystem sicher wesentlich am Lipidmetabolismus sowohl des Organismus, als auch der Leber beteiligt ist. Welchen Netto-Effekt, also Steatose-fördernd oder eher protektiv, das sympathische Nervensystem jedoch ausübt, bleibt angesichts einer sich teilweise widersprechenden Studienlage kontrovers.

2.2.4 Der mögliche Einfluss des SNS auf hepatische Inflammation und Fibrogenese

Neben der Beteiligung des sympathischen Nervensystems am „first hit“, also der Fettleberentstehung, gibt es Hinweise, dass Stress und somit als physiologische Antwort eine Aktivierung des SNS mit nachfolgender Ausschüttung von Catecholaminen die „second hits“, d. h. die hepatische Inflammation und Fibrose, moduliert.

Ursprünglich wurde ein gestörter hepatischer Blutfluss als der Hauptmechanismus angenommen, durch den das sympathische Nervensystem Stress-induziert an der Exazerbation von Lebererkrankungen beteiligt ist. Eine sympathische Aktivierung führt zur Vasokonstriktion und zentrilobulärer Hypoxie, was schließlich einen Leberschaden auslöst (Chida et al. 2006). Dies konnte sowohl in klinischen Studien (Hirose et al. 1961) als auch anhand von Tierexperimenten nachvollzogen werden (Chida et al. 2005).

SNS und hepatische Inflammation

Sowohl psychischer, als auch physischer Stress stimulieren über eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine, was aus Studien am Menschen und Nagern abgeleitet werden konnte (Seematter et al. 2004). Beim Menschen führte die Infusion von Isoprenalin, einem β -Agonisten, zu einem Anstieg von IL-6 im Plasma (Mohamed-Ali et al. 2000) und mentaler Stress bewirkte eine Induktion von NF- κ B in peripheren mononukleären Blutzellen. Nachvollzogen an Mäusen wurde diese Stimulation durch α_1 - und β -Rezeptoren vermittelt (Bierhaus et al. 2003). Daneben nimmt der Sympathikus neueren Studien zufolge auch direkt auf inflammatorische und immunologische Prozesse in der Leber Einfluss (Vere et al. 2009, Swain 2000, Fukudo et al. 1989). Noradrenalin und Clonidin, ein α_2 -Agonist, steigerten die TNF α -Freisetzung aus isolierten

Kupffer-Zellen. Analog führte die intraportale Infusion von Noradrenalin in vivo oder in isolierten Rattenlebern zu einer gesteigerten TNF α -Synthese, was durch die Co-Infusion von Yohimbin, einem α_2 -Rezeptorantagonisten, aufgehoben werden konnte (Zhou et al. 2001). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass eine chronische Alkoholexposition zu erhöhten Noradrenalin-Werten, einer Hochregulierung des α_{2A} -Adrenorezeptors auf Kupffer-Zellen und vermehrter Ausschüttung von TNF α führt (Ajakaiye et al. 2011). Durch Epinephrin konnte in der isoliert perfundierten Rattenleber zwar keine TNF α -Produktion, jedoch eine gesteigerte Synthese von IL-6 erzielt werden, einem weiteren proinflammatorischen Zytokin, das mit dem Fortschreiten hepatischer Inflammation in Verbindung gebracht wird (Liao et al. 1995). Aus Tiermodellen, im Rahmen derer den Versuchstieren Stress zugeführt wird, z. B. in Form von Immobilisation, konnte abgeleitet werden, dass Stress sowohl zu erhöhten Plasmawerten von IL-6, als auch zu einer gesteigerten hepatischen mRNA-Expression von IL-6 führt. Dies konnte durch 6-OH-DA, eine Substanz zur chemischen Sympathektomie, bzw. microchirurgische hepatische Sympathektomie vermindert werden (Chida et al. 2006). In vitro verursachte Norepinephrin einen Anstieg der IL-6-mRNA-Expression in Hepatozyten, jedoch nicht in Nicht-Parenchymzellen der Leber, was durch α_1 -, α_2 - und β -Rezeptorantagonisten partiell bzw. mit einer Kombination dieser komplett inhibiert werden konnte; in Nicht-Parenchymzellen hingegen konnte Noradrenalin die Synthese von IL-1 β stimulieren (Jung et al. 2000).

Abgesehen von dem fördernden Effekt auf die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen, können Catecholamine auch die Expansion von hepatischen NKT-Zellen stimulieren (Chida 2006). NKT-Zellen exprimieren β -Adrenorezeptoren, ihre Vermehrung kann durch β -Rezeptor-Agonisten gefördert und durch β -Rezeptor-Antagonisten behindert werden (Minagawa et al. 2000). Eine niedrige Noradrenalin-Aktivität in der Leber ist außerdem mit einer verminderten NKT-Dichte assoziiert, wobei eine Behandlung mit Noradrenalin zu einem Wiederanstieg der hepatischen NKT-Zellen führt (Li et al. 2004). NKT-Zellen überwachen und regulieren die Immunantwort (Minagawa et al. 2000) und können durch komplexe Mechanismen, die noch nicht vollständig verstanden sind, die Polarisierung der Immunantwort zwischen einem pro-inflammatorischen Th1- und einem anti-inflammatorischen Th2-Zytokinprofil einstellen. Es gibt Hinweise, dass eine verminderte NKT-Dichte eher einen pro-inflammatorischen Effekt ausübt (Li et al. 2004). So könnten Catecholamine über eine β -adrenerge Aktivierung von NKT-Zellen möglicherweise auch anti-

inflammatorisch wirken. Dieser anti-inflammatorische Effekt wird durch verschiedene Studien unterstrichen. So bewirkte die Stimulation von β_2 -Rezeptoren eine Abschwächung und die chemische Sympathektomie mittels 6-OH-DA eine Verschlimmerung des immunvermittelten Leberschadens (Tiegs et al. 1999) und sowohl der selektive β_2 -Agonist Clenbuterol als auch Noradrenalin konnten die Apoptose im Rahmen einer Fas-induzierten Leberschädigung inhibieren (André et al. 1999, Chida et al. 2005).

Insgesamt bedeutet dies, dass das sympathische Nervensystem wohl einen dualen Effekt, d.h. einerseits eine Verstärker- bzw. andererseits eine Hemmfunktion, auf die hepatische Inflamationsreaktion ausüben kann. Die genauen Mechanismen hinter diesem dualen Effekt sind derzeit noch kontrovers. Potenziell bestimmende Größen könnten die Dauer und Stärke der sympathischen Aktivierung, das jeweils in den verschiedenen Studien verwendete Modell des Leberschadens (Chida et al. 2006) bzw. möglicherweise auch die unterschiedliche hepatische Expressionsmuster von Adrenorezeptoren sein.

SNS und hepatische Fibrose

Mehrere unabhängige Untersuchungen anhand verschiedener Tiermodelle konnten eine Beteiligung des sympathischen Nervensystems an der hepatischen Fibrogenese herausstellen (Oben et Diehl 2004). Indirekte Hinweise auf diesen Zusammenhang ergeben sich daraus, dass spontan hypertensive Ratten (SHR), die im Gegensatz zu normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) ein überaktives sympathisches Nervensystem haben, eine stärkere Ausprägung der CCl₄-induzierten Leberschadens zeigen. Während SHR eine ausgeprägte Leberzirrhose entwickelten, konnte bei WKY nur eine Fibrose beobachtet werden (Hsu et al. 1995). Ohne jegliche Behandlung haben SHR einen erhöhten Catecholamin-Gehalt im Nebennierenmark, sowie eine dichte sympathische Leberinnervation im Vergleich zu Kontrolltieren (Hsu 1992). Auch die akute Leberschädigung durch CCl₄ war stärker ausgeprägt bei SHR, wohingegen eine chemische Sympathektomie mittels 6-OH-DA insbesondere bei SHR in einer Abschwächung des Leberschadens resultierte (Hsu et al. 1993). Desweiteren sind Tiere mit niedrigen Catecholamin-Werten bzw. einem abgeschwächten SNS Tonus, wie z. B. Leptin-defiziente ob/ob-Mäuse (Young et Landsberg 1983), vor einer Leberfibrose geschützt (Honda et al. 2002) und 6-OH-DA bzw. der α_1 -Antagonist Prazosin konnten die CCl₄-induzierte Leberfibrose inhibieren (Dubuisson et al. 2002). Diese Ergebnisse legen also die Vermutung nahe, dass zirkulierende endogene

Catecholamine maßgeblich an der Leber-Fibrogenese beteiligt sind. Interessanterweise ist auch die epidermale Wundheilung massiv gestört bei Ratten, die mit 6-OH-DA behandelt wurden (Kim et al. 1998), was darauf schließen lässt, dass eine noradrenerge Antwort ein zentrales Merkmal von Gewebe-Reparationsvorgängen darstellt.

Als Zielzellen, über die das sympathische Nervensystem Einfluss auf die hepatische Fibrogenese nimmt, konnten die hepatischen Sternzellen (HSC) identifiziert werden. HSC sind die wichtigsten fibrogenen Zellen in der Leber. Sie werden durch Leberschäden verschiedenster Ursachen aktiviert und vollziehen daraufhin eine Verwandlung von einer ruhenden Zelle zu einem Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp. Sie werden daraufhin proliferativ und exprimieren α -SMA und andere fibrogene Matrixproteine, die während der Leberzirrhose akkumulieren (Friedmann 2000). Elektronenmikroskopische Studien konnten zeigen, dass HSC in der menschlichen Leber in nahem Kontakt mit Nervenfasern stehen (Bioulac-Sage et al. 1990). HSC ihrerseits exprimieren die Schlüsselenzyme der Catecholamin-Synthese Tyrosin-Hydroxylase und Dopamin- β -Hydroxylase, synthetisieren Noradrenalin und schütten dieses aus. Außerdem konnte in HSC die Expression von α_1 -, β_1 - und β_2 -Rezeptoren nachgewiesen werden (Oben et al. 2004, Yang et al. 2008). Daraus entstand die Hypothese, dass HSC hepatische Neurogliazellen sind, die sowohl Norepinephrin produzieren, als auch davon reguliert werden (Oben et al. 2004). Noradrenalin stimuliert das Wachstum von HSC in Zellkultur (Oben et al. 2004, Yang et al. 2008, Liu et al. 2007), wohingegen α_1 - und β -Antagonisten (Liu et al. 2007) wie Prazosin bzw. Propranolol (Oben et al. 2004) die Proliferation hemmen. Ebenso kann Neuropeptid Y, ein Cotransmitter des SNS, der zusammen mit Norepinephrin aus sympathischen Nervenendigungen freigesetzt wird, die Proliferation von HSC stimulieren (Oben et al. 2003). Daneben wirkt Noradrenalin auch Apoptose-hemmend auf HSC (Liu et al. 2007). Abgesehen von Zellkultur-Studien konnte desweiteren gezeigt werden, dass Noradrenalin in intakten Mäusen ebenfalls HSC reguliert. Eine chronische Infusion von Norepinephrin in Leptin-defiziente ob/ob-Mäuse, von denen man weiß, dass sie niedrige Noradrenalin-Werte haben und trotz einer chronischen Steatohepatitis vor einer Leberfibrose geschützt sind, resultierte in vivo in einer Stimulation der Proliferation von HSC, sodass sich die Anzahl der HSC in den Lebern der Leptin-defizienten Mäuse der ihrer schlanken Kontrollen annäherte (Oben et al. 2004). Da jedoch Leptin selbst über die Interaktion mit einem eigenen Rezeptor auf HSC deren Proliferation aktivieren kann, wurde durch Untersuchungen an Noradrenalin-

defizienten Dbh^{-/-} Mäusen die Möglichkeit des Vorspielens eines falschen Zusammenhangs durch die Leptin-Defizienz ausgeschlossen: die Fütterung einer Antioxidantien-defizienten Diät, die in intakten Mäusen eine Steatohepatitis mit Fibrose auslöst, induzierte bei Wildtypmäusen eine ausgeprägte Akkumulation von HSC, wohingegen in den Lebern der Noradrenalin-defizienten, jedoch normal Leptin-exprimierenden Mäuse keine HSC nachgewiesen werden konnten. Die Infusion des β -Agonisten Isoprenalin hob die Anzahl der der aktivierten HSC in Dbh^{-/-} Mäusen auf die Werte bei Wildtypmäusen an (Oben et al. 2004).

Neben einer Aktivierung zur Proliferation stimulieren Catecholamine die Expression fibrogener Matrixproteine und pro-fibrogener Zytokine (Oben et Diehl 2004). In Zellkultur regt Noradrenalin die Expression von Collagen-1, α -SMA und TGF- β an (Yang et al. 2008, Oben et al. 2003). Ebenso führt in vivo die Behandlung von ob/ob-Mäusen mit Noradrenalin zur einer gesteigerten Expression von Collagen-mRNA und TGF- β 1 im Lebergewebe (Oben et al. 2004), sowie einer histologisch nachweisbaren Fibrose (Oben et al. 2003). Umgekehrt zeigen Dbh^{-/-} Mäuse eine signifikant verminderte Expression von Collagen und TGF- β 1 gegenüber ihren Wildtyp-Kontrollen (Oben et al. 2004).

Die Erkenntnis, dass neben Noradrenalin auch der parasympathische Neurotransmitter Acetylcholin in Zellkulturversuchen die Proliferation von HSC, sowie deren Expression von Collagen-Genen stimuliert (Oben et al. 2003), ist eine weitere Stütze für die Hypothese, die HSC als hepatische Neurogliazellen auffasst.

Der zweite Zelltyp, der in der Leber an der Bildung eines neuroendokrinen Kompartiments beteiligt ist, sind die Progenitor-Zellen, wegen ihres Aussehens auch „hepatic oval cells“ (HOC) genannt. Diese sind pluripotente fakultative Stammzellen, die sich zu Hepatozyten und Gallengangzellen differenzieren können (Roskams et al. 2004). Sie werden durch alle Arten des chronischen Leberschaden aktiviert, u. a. auch im Rahmen der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis (Roskam 2003), wenn reife Hepatozyten ein kritisch niedriges Level erreichen, und sind an Reparations- und Regenerationsvorgängen in der Leber beteiligt (Oben et Diehl 2004). Es zeigte sich nun, dass auch diese Zellen einer Regulation durch das sympathische Nervensystems unterliegen, wobei eine Inhibition des SNS mit einer Akkumulation von HOC und einer damit verbundenen Abschwächung des Leberschadens verbunden war (Oben et al. 2003). So konnten gegenüber den Kontroll-Mäusen, die nur mit einer Antioxidantien-defizienten Diät gefüttert wurden, bei Mäusen, die dieselbe Diät

erhielten und zusätzlich mit dem α_1 -Rezeptorantagonisten Prazosin bzw. mit 6-OH-DA zur chemischen Sympathektomie behandelt wurden, eine signifikant erhöhte Anzahl hepatischer Progenitor-Zellen festgestellt werden. Diese gesteigerte HCO-Akkumulation war mit einer Milderung der hepatischen Nekrose und Steatose sowie mit niedrigeren Serum-Transaminasen assoziiert. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass HOC α_1 -Adrenorezeptoren exprimieren (Oben et al. 2003). Ein weiterer Hinweis auf die sympathische Regulation der Leber-Regeneration ist, dass Ratten nach hepatischer Denervierung nach einer Zwei-Drittel-Hepatektomie signifikant mehr hepatische Progenitorzellen zeigten als nicht-denervierte Ratten (Soyama et al. 2012).

Insgesamt lassen die Ergebnisse der beschriebenen Studien den Schluss zu, dass eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems während einer Lebererkrankung die Entstehung einer Leberfibrose fördert, indem hepatische Sternzellen aktiviert werden, und gleichzeitig durch eine Behinderung der Expansion hepatischer Progenitor-Zellen die Regeneration der Leber inhibiert (Oben et Diehl 2004). Diese Daten fördern also die Auffassung, dass eine Inhibition des Sympathikotonus sich protektiv auf den Verlauf von Erkrankungen der Leber, inklusive der NASH, auswirken könnte.

2.3 Tiermodelle zur NASH

Es gibt zwei Hauptkriterien, die ein ideales Tiermodell zur NASH erfüllen sollte (Larter et al. 2008):

Einerseits sollte das typische pathologische Muster des Leberzellschadens, das eine NASH auszeichnet, erreicht werden. So sollten die histologischen Kriterien Steatose, Inflammation, Leberzellschaden, v. a. im Sinne einer Ballonierung der Hepatozyten, sowie eine Fibrosierung mit für die NASH spezifischer Faservermehrung mit perivenulärem und perizellulärem Verteilungsmuster, auch „chicken-wire“-Muster genannt, abgebildet werden.

Andererseits sollte der Kontext simuliert werden, der auch beim Menschen zu eben diesen pathologischen Veränderungen führt. Es sollten also auch die zugrunde liegenden Risikofaktoren und metabolischen Kenngrößen abgebildet werden, also Adipositas, Insulinresistenz, Hyperglykämie, Dyslipidämie und ein verändertes Adipokin-Profil.

Verständlicherweise führen Defizite in einem der beiden Punkte, also entweder in der Leber-Pathologie oder dem metabolischen Kontext, zu Schwierigkeiten in der Übertragbarkeit eines Tiermodells auf das klinische Setting beim Menschen.

Generell können die bestehenden Tiermodelle zur NASH in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden, nämlich auf der einen Seite in genetische Modelle und auf der anderen Seite diätetische Modelle (Anstee et al. 2006). Nachfolgend sollen die gängigsten Modelle dieser beiden Hauptgruppen mit ihren spezifischen Vor- und Nachteilen beschrieben und charakterisiert werden. Ein Nachteil jedoch, das allen Modellen immanent ist, ist die Tatsache, dass die NASH, eine chronische, sich über viele Jahre hinweg entwickelnde Erkrankung, über den Zeitraum von nur Wochen oder wenigen Monaten untersucht wird (Schattenberg et al. 2010).

2.3.1 Genetische NASH-Modelle

Es wurden im Laufe der NASH-Forschung verschiedenste genetische Modelle mit entweder verminderter oder erhöhter Expression von Genen etabliert, die jedoch alle als Nachteil gemeinsam haben, dass sie zum einen relativ teuer und deshalb nicht sehr weit verbreitet sind (Fan et al. 2009). Zum anderen handelt es sich bei der NASH um eine multifaktorielle

Erkrankung. So scheint es plausibel, dass ein Modell, das nur auf der veränderten Expression eines einzelnen Gens beruht, nur ungenügend die Erkrankung widerspiegeln kann.

Ein weit verbreiteter Angriffspunkt im Rahmen genetischer NASH-Modell ist der Leptin-Signalweg. Leptin ist ein Peptid-Hormon, das vom Fettgewebe synthetisiert wird und zentral die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch steuert, sowie außerdem die zelluläre Immunabwehr, den Zelltod und die Fibrogenese reguliert (Friedmann 2009). So kann Leptin als neuroendokriner Faktor auf Hunger reagieren. Wird Fettgewebe in Hungerzeiten abgebaut, sinkt der Leptin-Spiegel und es entsteht der Antrieb zur Nahrungssuche. Gleichzeitig wird die Schilddrüse, das Wachstumshormonsystem und die adreno-kortikale Achse supprimiert, um Energie einzusparen (Ahima et al 2000). Es gibt nun die Möglichkeit, Mäuse mit entweder gestörtem Leptin-Rezeptor (db/db- bzw. fa/fa-Mutation) oder mit einer Mutation des Liganden (ob/ob-Mäuse) zu erzeugen, die in weiten Teilen, aber nicht exakt in ihrem Phänotyp übereinstimmen (Halaas et al. 1995, Chen et al. 1996). Ob/ob-Mäuse entwickeln eine Adipositas und Fettleber in Abwesenheit von Leptin, wohingegen die Fettleibigkeit beim Menschen mit einer Hyperleptinämie vergesellschaftet ist (Friedmann 2009), weshalb man beim Menschen eher von einer Leptin-Resistenz ausgehen muss. Deshalb kommt die db/db- bzw. fa/fa-Variante mit einem Rezeptor-Defekt und begleitender Hyperleptinämie dem Menschen vermutlich näher.

Modelle mit verändertem Leptin-Signalweg sind v. a. gut zur Untersuchung der Steatose-Entstehung geeignet, da sie gut eine Adipositas mit metabolischen Risikofaktoren wie erhöhtem Anteil visceralen Fettgewebes simulieren und eine ausgeprägte hepatische Steatose erzeugen. Außerdem ist wegen der zentralnervösen Wirkung von Leptin auch die zentrale Appetitregulation verändert, was beim Menschen ebenfalls eine Rolle spielt (Schattenberg et al. 2010). Abstriche müssen hinsichtlich Inflammation und Fibrose gemacht werden, da eine Leptin-Mutationen nicht spontan zur Entstehung einer Steatohepatitis führt (Larter et al. 2008). Desweiteren sind ob/ob-Mäuse vor der Entstehung einer Fibrose geschützt (Leclercq et al. 2002). Man benötigt deshalb zur Erzeugung einer Steatohepatitis einen zweiten Mechanismus wie den Einfluss von Lipopolysacchariden oder einer Methionin-Cholin-defizienten Diät.

Ein weiteres genetisches Modell assoziiert mit Insulinresistenz sind transgene Mäuse mit einer Überexpression von Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c), die

analog wie bei der kongenitalen Lipodystrophie eine schwere Insulinresistenz und einen Diabetes mellitus sekundär zu einer gestörten Fettgewebsdifferenzierung entwickeln. Da SREBP-1c lipogene Faktoren reguliert, resultiert eine gesteigerte Expression desselben in einer vermehrten Produktion von Fettsäuren und Cholesterol, was sich dann in die Hepatozyten einlagern kann und dort zu einer Steatose, Inflammation, Ballonierung und perizellulärer Fibrose führt (Horton et al. 1998, Nakayama et al. 2007). Jedoch kommt es wie bei der Lipodystrophie zu einem Abbau des weißen Fettgewebes, was also im Gegensatz zur NASH-Entstehung beim Menschen steht, wo die Adipositas einen wichtigen Eckpfeiler darstellt. Ein weiterer Nachteil ist ein reduzierter Leptin-Spiegel, vergleichbar mit den Leptin-defizienten Modellen. Somit ist dieses Modell eher für Studien zur Lipodystrophie-assoziierten Steatohepatitis geeignet, wo es ebenfalls zu einem erniedrigten zirkulierenden Leptin und reduzierten peripheren Fettgewebe kommt (Larter et al. 2008, Schattenberg et al. 2010).

Darüber hinaus gibt es noch eine Reihe anderer Genmutationen. Acyl-Coenzym-A-Null (AOX^{-/-}) Mäuse zeigen eine gestörte peroxisomale β -Oxidation und entwickeln daraufhin eine Steatohepatitis, die sich jedoch nach einer gewissen Zeit wieder erholt aufgrund einer kompensatorisch gesteigerten Fettsäureoxidation. Methionin-Adenosyltransferase-1A-Null (MAT1A^{-/-}) Mäuse entwickeln eine Steatohepatitis auf dem Boden eines verminderten Spiegels an Antioxidantien und abgeschwächten Aktivität an der Lipid-Oxidation beteiligten Enzyme. Die zuletzt genannten Modelle zeigen eine spontane Tendenz zur Entwicklung hepatischer Adenome und HCC und sind deswegen gut zur Untersuchung der Progression von der NASH zum HCC geeignet (Fan et al. 2009).

2.3.2 Diätetische NASH-Modelle

Im Bereich der diätetischen NASH-Modelle können wiederum drei verschiedene Ansätze unterschieden werden. Es gibt Nahrungsbestandteil-defiziente Modelle, wobei hierunter das bekannteste die Methionin-Cholin-defiziente (MCD) Diät darstellt. Davon abzugrenzen sind Fettnahrungen, bei denen der größte Anteil der zugeführten Kalorien aus Fetten stammt, und sogenannte atherogene Diäten, bei denen zusätzlich zu einem erhöhten Fettanteil Cholesterol und Cholin substituiert werden. Insgesamt haben diätetische Modelle einen hohen Stellenwert in der NASH-Forschung, da sich hier die Verfettung auf dem Boden

ernährungsbedingter Störungen entwickelt und nur die wenigsten Patienten einen genetischen Defekt aufweisen (Schattenberg et al. 2010).

Jedoch ist das mit am weitesten verbreitete diätetische NASH-Modell die MCD-Diät, d. h. eine Diät, die reich an Sucrose (40 %) und Fett (10 %) ist, der jedoch zwei Bestandteile, nämlich Methionin und Cholin, fehlen. Hier liegt bereits ein Kritikpunkt an der MCD-Diät, da eine Ernährung, in der distinkte Bestandteile fehlen, nur bedingt übertragbar auf den Menschen ist. Durch eine gesteigerte Fettsäureaufnahme in die Leber, verminderte VLDL-Sekretion und eine gestörte β -Oxidation entsteht unter einer MCD-Diät eine hepatische Fettakkumulation, wobei es v. a. auch zu einer ausgeprägten Inflammation und Zellschaden kommt, ein großer Vorteil dieser Diät (Schattenberg et al. 2010). Durch einen erhöhten oxidativen Stress folgt eine Aktivierung proinflammatorischer Moleküle wie Interleukin-6, TNF- α und NF κ B, was ein großes fibrogenes Signal darstellt (Fan et al. 2009). Ein großer Nachteil an der MCD-Diät hingegen ist, dass die Hauptrisikofaktoren, die beim Menschen mit der Erkrankung vergesellschaftet sind, nur ungenügend abgebildet werden. So kommt es unter der Diät nicht zur Ausprägung einer Adipositas oder eines Diabetes mellitus, vielmehr resultiert unter ihr bei Mäusen eine ausgeprägte Gewichtsabnahme und Reduzierung des visceralen Fettgewebes (Rinella et al. 2008), sodass eher eine gesteigerte Insulin-Sensitivität als eine Insulinresistenz entsteht (Rinella et al. 2004). Somit ist das MCD-Modell gut geeignet zum Studium der Pathophysiologie des intrahepatischen Zellschadens und der hepatischen Regenerationsvorgänge, während es nur ungenügend den metabolischen Kontext wiedergeben kann, da die anderen Organe nur wenig bzw. nicht im korrekten Sinne erfasst werden.

Anders ist die Situation bei Modellen, in denen die NASH durch eine Fettnahrung induziert wird. Bei diesen Diäten beträgt der Fettanteil üblicherweise mehr als die Hälfte der zugeführten Kalorien, was sehr gut an westliche Ernährungsgewohnheiten herankommt. Der große Vorteil dieser Fett-Diäten ist eine sehr gute Simulation des metabolischen Kontextes der Krankheitsentstehung. So entwickeln Mäuse unter einer Fettnahrung eine Adipositas, eine Glucose-Intoleranz, Hyperleptinämie, Dyslipidämie, eine gesteigerte Expression lipogener Transkriptionsfaktoren wie SREBP-1c und PPAR γ , sowie eine gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine im weißen Fettgewebe (Deng et al. 2005). Obwohl es längerer Fütterungszeiten bedarf und die Tiere unter der Fettnahrung nicht eine

so ausgeprägte Steatohepatitis zeigen wie unter einer MCD-Diät – die Hauptnachteile der Fett-Diäten gegenüber dieser – kommen solche Modelle der Pathophysiologie beim Menschen wohl näher, mit einer zentralen Rolle des weißen Fettgewebes als Ursprung proinflammatorischer Signale und metabolischer Störungen (Hotamisligil 2006).

Der westliche Lifestyle kann noch weiter simuliert werden. So kann die Fettnahrung mit der Gabe von Fructose-Sirup kombiniert werden, was einem typischen fast-food Menü sehr nahe kommt. Sorgt man desweiteren für eine Inaktivität der Versuchstiere, z. B. in Form von sehr einfach erreichbaren Futters oder die Entfernung von Laufrädern aus den Käfigen, kann ein weiterer wichtiger Faktor des metabolischen Syndroms und daher der NASH beim Menschen, nämlich die körperliche Inaktivität, nachgeahmt werden (Tetri et al. 2008).

Die dritte Schiene diätetischer Modelle stellen die atherogenen Diäten dar, die sich dadurch auszeichnen, dass neben einem hohen Fettanteil außerdem Cholesterol und Cholat zugefügt werden. Interessanterweise teilen die Atherosklerose und die NASH in weiten Teilen ihre pathogenetischen Ursachen, außerdem ist eine große Überschneidung der NASH-Patienten mit den Atherosklerose-Erkrankten feststellbar. Tatsächlich scheint die NAFLD bzw. NASH die Entwicklung einer Arteriosklerose zu begünstigen (Loria et al. 2008, Sookoian et Pirola 2008, Targher et Arcaro 2007). Aus diesem Grund wurde ein Tiermodell, das ursprünglich designed wurde, um bei Nagern eine Atherosklerose zu induzieren (Paigen et al. 1985) auf die NASH übertragen. So wurde festgestellt, dass eine Diät mit einem Fettanteil von 35 %, sowie einem Zusatz von 1,25 % Cholesterol und 0,5 % Cholat eine Fetteinlagerung im Sinne einer Steatosis hepatis, sowie im Verlauf das Vollbild einer NASH mit Steatohepatitis und Fibrosierung auslöst (Jeong et al. 2005, Matsuzawa et al. 2007). Außerdem untersuchte die Gruppe um Matsuzawa systematisch den Einfluss dieser atherogenen Paigen-Diät auf den Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel bei der Maus und konnte demonstrieren, dass die Paigen-Fütterung ein geeignetes Modell zum Studium der NASH einschließlich der Progression der hepatischen Fibrose darstellt.

3. Ziel der Studie

Aus den Ausführungen im Teil „Hintergrund“ wird klar, dass viele potenzielle pathogenetische Mechanismen bekannt sind, die den Verlauf der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung beeinflussen könnten. Bis auf die Vermeidung der Risikofaktoren bzw. einer Behandlung des Metabolischen Syndroms steht jedoch bis heute noch kein geeignetes Medikament zu Verfügung, für das ein positiver Effekt auf die NASH gesichert ist.

Das sympathische Nervensystem spielt in der Regulation des Metabolismus eine große Rolle. Außerdem konnte aus verschiedenen Tiermodellen und Zellkulturversuchen abgeleitet werden, dass es möglicherweise regulatorisch auf eine hepatische Verfettung, Inflammation und Fibrose einwirkt.

In der vorliegenden Studie sollten nun unseres besten Wissens zum ersten Mal anhand eines rein diätetischen in-vivo-Tiermodells folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Welchen Effekt hat eine Inhibierung des sympathischen Nervensystems auf die Entwicklung des „first hit“, der hepatischen Steatose?
2. Hat ein verminderter Sympathikotonus positive Auswirkungen auf den Leberschaden, sowie die hepatische Inflammation und Fibrose, also den „second hit“?
3. Wie verändert sich die hepatische sympathische Innervation im Rahmen der NASH?

4. Material und Geräte

4.1 Substanzen

Tabelle 1: Substanzen

6-Hydroxydopamin (6-OH-DA)	Sigma, Steinheim
Ascorbinsäure	Sigma, Steinheim
BSA (Bovines Serum-Albumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eosin Y Solution	Sigma, Steinheim
Ethanol 99 %	Apotheke Universitätsklinikum Regensburg
FCS (Fetales Kälber-Serum)	PAN Biotech, Aidenbach
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
goat-Serum	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heparin Natrium 25000	Ratiopharm, Ulm
Ketamin 10 %	WDT, Garbsen
Mayers Hämatoxylin	Sigma, Steinheim
NaCl, 0,9 %, steril	Braun, Melsungen
Paigen reform Futter	Ssniff, Soest
Saccharose	Merck, Darmstadt
Standardfutter Ssniff® R/M-H	Ssniff, Soest
Tissue Tek	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylazin 2 %	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Xylol	Baker, Griesheim

PBS-Puffer (phosphat buffered saline):

Tabelle 2: Zusammensetzung des PBS-Puffers

140 mM NaCl	
10 mM KCl	
6.4 mM Na ₂ HPO ₄	
2 mM KH ₂ PO ₄	pH 7.4

4.2 Laborgeräte

Tabelle 3: Laborgeräte

ABI PRISM® 7900 HT Sequence detection system	Taqman, Applied Biosystems, Foster City, USA
Biofuge fresco Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau
Cryo-Tubes	Nunc, Roskilde, Dänemark
DAKO fluorescent mounting medium	Dako, Hamburg
Deckgläschen Kryo-Schnitte	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläschen Paraffin-Schnitte	Carl Roth, Karlsruhe
Discardit Einmalspritzen, 1/2/5/10 ml steril	Becton-Dickinson, Heidelberg
Eismaschine UBE 125	Ziegra, Isernhagen
Entellan	Merck, Darmstadt
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Leitz DMRBE	Leica, Wetzlar
Flüssiger Stickstoff	Linde Technische Gase
GeneAmp® PCRcycler	Applied Biosystems, Foster City, USA
Glasbehälter, versch. Volumina	Schott, Mainz
Insulinspritzen, Micro-Fine 1 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg
Kamera Fluoreszenzmikroskop SPOT RT color	Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA
Kryotom CM 3050 S	Leica, Nussloch
Laborwaage Scout II	Ohaus, Florham Park, NJ, USA
Magnetrührer, IKAMag REO	Heidolph, Kelheim
Microlance Kanülen, 20/22 G	Becton-Dickinson, Heidelberg
Mikroskop Olympus CKX41 mit ALTRA20 soft imaging system	Olympus, Hamburg
Mikrotom HM 400	Microm, Walldorf
Objektträger Paraffinschnitte	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pasteurpipetten 5/10/20 ml	Brand, Wertheim
Pipetten (10/100/200/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg

Pipettierhilfe Accu-jet	Brand, Wertheim
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Reaktionsgefäße 1/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15/50 ml	Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg
Reinstwasseranlage Milli-Q-Plus	Ultra Pure Water Systems, Billerica, USA
Software Kamera Fluoreszenzmikroskop SPOT RT Software V. 3.1	Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA
Superfrost Plus Objektträger (Kryoschnitte)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Tierwaage	Sartorius, Göttingen
Vortex Genie 2 Mixer	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad Haake W13/C10	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

5. Methoden

5.1 Tiermodell und Ablauf der chemischen Sympathektomie

Als Versuchstiere dienten weibliche, bei Ankunft 6 Wochen alte BALB/c Mäuse, bezogen von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden in einem klimatisierten Stall mit konstanter Temperatur von 22 °C und einem 12-Stunden Hell-Dunkel-Zyklus gehalten, mit freiem Zugang zu Wasser und Futter. Nach einer Akklimatisierungsphase von drei Wochen wurden die Tiere mit einer Ohrmarke zur individuellen Identifikation gekennzeichnet und anschließend nach dem Zufallsprinzip in vier Gruppen aufgeteilt, wobei jeweils zwei Gruppen weiterhin mit dem Standardfutter (Ssniff® R/M-H Cat.# V1534-0) und zwei Gruppen mit einer NASH-induzierenden Diät gefüttert wurden. Die verwendete NASH-Diät ist auch bekannt als Paigen-Diät, da sie ursprünglich von einer Gruppe um Dr. Beverly Paigen entwickelt wurde, um bei Mäusen nach einer Langzeit-Fütterung atherogene Läsionen hervorzurufen. Das Paigen-Futter wurde nach einer Modifikation der Rezeptur von Matsuzawa et al. zusammengestellt. Diese Gruppe hatte kürzlich herausgefunden, dass dieses Futter, bestehend aus Standard-Futter, angereichert mit 7,5 % Fett (Kakaobutter), 1,25 % Cholesterol und 0,5 % Cholat im Mausexperiment das Vollbild einer NASH induziert, mit allen histologischen Kriterien einer NASH, d. h. einer signifikanten hepatischen Steatose, Inflammation, Fibrose und Ballonierung der Hepatozyten. Die Anhebung des Fettanteils auf 60 % konnte die NASH-Entstehung zusätzlich beschleunigen (Matsuzawa et al. 2007). Die Modifikation bestand nun darin, den Fettanteil auf 35 % zu setzen, und Schweineschmalz anstatt von Kakaobutter zu verwenden. Cholesterol und Cholat wurden bei 1,25 bzw. 0,5 % belassen. Wegen dieser Veränderung der Zusammensetzung im Vergleich zur ursprünglichen Paigen-Diät wurde das Futter Paigen-Reform-Diät benannt. Sowohl das Standard-Futter, als auch die Paigen-Reform-Diät wurden von Ssniff (Soest, Deutschland) bezogen. Das gesamte Versuchsprotokoll wurde nach den Richtlinien zum Einsatz und der Pflege von Labortieren der Regierung der Oberpfalz, Bayern durchgeführt (AZ 621-2531.1-23/00).

Eine Woche nach Umstellung der Diät wurde mit der chemischen Sympathektomie mittels 6-Hydroxydopamin (6-OH-DA) begonnen wie vorher beschrieben (Härle et al. 2005). Initial wurde den Tieren an drei aufeinander folgenden Tagen 80 mg pro kg Körpergewicht 6-OH-DA, gelöst in 0,1 % Ascorbinsäure in 0,9 % Kochsalzlösung (NaCl) intraperitoneal injiziert. Um einen dauerhaften Effekt zu erzielen und eine permanente Zerstörung der sympathischen

Nervenfasern sicherzustellen, wurden die Injektionen mit 6-OH-DA im Laufe des Experiments alle 10 Tage bis zum Ende des Versuchs 24 Wochen nach der initialen Sympathektomie wiederholt. Die Kontrolltiere wurden nur mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Alle 10 Tage wurde außerdem das Gewicht jedes Versuchstieres bestimmt. Somit ließen sich 4 Gruppen unterscheiden: Gruppe I bzw. Kon (6 Tiere) mit Standardfutter und NaCl-Behandlung; Gruppe II bzw. Sx (12 Tiere): Standardfutter und 6-OH-DA; Gruppe III bzw. Paigen (12 Tiere): Paigen-Reform-Diät und NaCl; Gruppe IV bzw. Paigen+Sx (12 Tiere): Paigen-Reform-Diät und 6-OH-DA.

Tabelle 4: Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Gruppe Nr.	Bezeichnung	Futter	Behandlung
I	Kon	Standard	NaCl
II	Sx	Standard	6-OH-DA
III	Paigen	Paigen reform	NaCl
IV	Paigen+Sx	Paigen reform	6-OH-DA

Nach 24 Wochen erfolgte nach einer Fastenperiode von 12 Stunden und einer abschließenden Bestimmung des Körpergewichts die Organentnahme. Dazu wurden die Versuchstiere mit einem Anästhesie-Cocktail aus 2 Teilen Xylazin 2 %, 3 Teilen Ketamin 10 % und 4 Teilen 0,9 % Kochsalzlösung durch intraperitoneale Injektion von 0,05 – 0,1 ml bis zur vollständigen Bewusstlosigkeit und Analgesie narkotisiert. Nach der Eröffnung des Abdomens und anschließend des Zwerchfells von kaudal konnte mit einer Heparin-benetzten 1 ml Spritze venöses Blut aus dem rechten Ventrikel entnommen werden. Anschließend wurde ein Foto des Situs angefertigt und nach Entnahme der Leber außerdem auch ein Foto der Leber separat. Das Gewicht der Lebern wurde jeweils bestimmt, bevor die Organe in Aliquots für die verschiedenen Messungen zerteilt wurden. Außerdem wurde ein Stück Dünndarm und die Milz entnommen, von welcher ebenfalls das Gewicht bestimmt wurde.

5.2 Aufbereitung und Analyse der Blutproben: Messung der Transaminasen

Nach der Entnahme venösen Blutes aus dem rechten Ventrikel wurde das Blut zur Gewinnung von Serum 5 Minuten bei 10.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Anschließend

wurde das Serum bis zur weiteren Diagnostik in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert. Zur Bestimmung der Transaminasen AST und ALT wurde das Serum wieder aufgetaut und teilweise zur Erzielung eines größeren Volumens mit PBS verdünnt. Die Messung der Transaminasen erfolgte durch Laborautomaten (Advia 1800 analyzer, Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland) in der Routine-Diagnostik der Abteilung für klinische Chemie und Labordiagnostik des Universitätsklinikum Regensburg. Nach Abschluss der Messung wurde das Ergebnis wieder um den jeweiligen Verdünnungsfaktor korrigiert.

5.3 Messung des hepatischen Lipid-Gehaltes

5.3.1 Extraktion der Lipide aus dem Lebergewebe

Die intrahepatischen Lipide wurden nach einer von Folch et al. publizierten Methode aus dem Gewebe extrahiert (Folch et al. 1957). Dazu wird ca. 50 mg Lebergewebe abgewogen. Anschließend wird zum Gewebe 1 ml eines 2:1 Chloroform/Methanol-Mix zugegeben, was nach 1 Stunde Raumtemperatur zu einer Homogenisierung des Gewebes führt. Danach fügt man 200 µl aqua dest. zu, vortext und zentrifugiert für 5 Minuten bei 3.000 U/min, wodurch man ein biphasisches System erhält, wobei die obere Phase aus dem Nicht-Lipid-Anteil mit einem vernachlässigbar geringen Gehalt an Lipiden, und die untere Phase aus dem Lipid-Anteil besteht. Die untere Phase wird nun abgezogen, in ein neues Gefäß überführt und über Nacht an der Luft getrocknet. Am nächsten Tag wird das entstandene Pellet re-suspendiert mittels 60 µl tert-Butanol und 40 µl eines 2:1 Mix aus Triton-X-114 und Methanol. Es liegen nun also alle in dem vorher auf ca. 50 mg abgewogenen Leberstück enthaltenen Lipide in 100 µl gelöst als Lipid-Extrakt vor. Aus diesem Extrakt können Triglyceride, freie Fettsäuren und Cholesterin bestimmt werden, was im Folgenden beschrieben wird.

5.3.2 Bestimmung des intrahepatischen Triglycerid-Gehalts

Zur Messung der intrahepatischen Triglyceride wurde der Triglycerid GPO-PAP Kit (cat. no. 12016648122, Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen enzymatischen Farb-Test, wobei das Testprinzip eine enzymatische Spaltung der Triglyceride mit nachfolgender Bestimmung des entstandenen Glycerins in einer Farbreaktion ist. Dazu wurden zu 2 µl des Lipid-Extraktes (Probe) bzw. eines Glycerol-Standards (Stand) bekannter Konzentration (c_{Stand}) 200 µl des im Kit enthaltenen Reagenz zugegeben und 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Innerhalb der nächsten 30 Minuten wurde die Extinktion (E) gegen das

Reagenz bei einer Wellenlänge von 540 nm im Photometer bestimmt. Unter Verwendung folgender Formel ergibt sich dann die Konzentration (c_{Probe}) der Triglyceride im Lipid-Extrakt:

$$c_{\text{Probe}} = (E_{\text{Probe}} / E_{\text{Stand}}) \times c_{\text{Stand}}$$

5.3.3 Bestimmung des intrahepatischen Gehalts an freien Fettsäuren

Zur Ermittlung der im Lebergewebe enthaltenen Menge an freien Fettsäuren wurde der Free fatty acids Half-micro test (cat. no. 11 383 175 001, Roche, Penzberg, Deutschland) angewendet. Auch bei diesem Test handelt es sich um einen enzymatischen Farbstest mit folgendem Reaktionsprinzip: die zu quantifizierenden freien Fettsäuren reagieren mit dem im Kit enthaltenen Coenzym A und unter dem Einfluss der Acyl-CoA-Synthetase zu Acyl-CoA. Dieses Acyl-CoA wird im nächsten Reaktionsschritt von der Acyl-CoA-Oxidase unter Anwesenheit von Sauerstoff oxidiert, wobei H_2O_2 entsteht, was wiederum unter Anwesenheit von Peroxidase, 4-Aminoantipyrin und 2,4,6-tribromo-3-hydroxy-Benzoesäure letztendlich zu einem roten Farbstoff reagiert, der Licht der Wellenlänge 546 nm absorbiert. Diese Absorption kann schließlich im Photometer bestimmt werden.

Bei der Messung wurden nun 5 µl des Lipid-Extraktes (Probe) bzw. einer Nullprobe (Blank) aus aqua bidest. zu 100 µl eines ersten Reaktionsmixes A pipettiert, in dem alle Substrate und Enzyme für die oben beschriebenen Reaktionen vorhanden sind, bis auf das Enzym Acyl-CoA-Oxidase, sodass in der anschließenden Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur die Reaktion der Acyl-CoA-Synthetase ablaufen konnte. Danach wurde dem Reaktionsansatz 5 µl einer ebenfalls in Kit vorhandenen Lösung mit N-ethyl-meleinimid zugegeben, was einen im Ansatz eventuell vorhandenen Überschuss an Coenzym A entfernen soll, bevor die Oxidation der aktivierten Fettsäuren gestartet wird. Nun wurde die Absorption A_1 bestimmt. Anschließend wurde der Reaktionsmix B, in dem die Acyl-CoA-Oxidase vorhanden ist, zupipettiert, sodass sowohl die Oxidation, als auch die Peroxidation und somit die Farbreaktion ablaufen konnten. Nach 15 Minuten konnte die Absorption A_2 gemessen werden. Zur Berechnung der Konzentration wurde zuerst eine Differenz $A_2 - A_1 = A_{\text{Probe}}$ bzw. A_{Blank} bestimmt, dann wurde aus der Differenz $A_{\text{Probe}} - A_{\text{Blank}} = \Delta A$ die absolute Änderung der Absorption durch die abgelaufene Farbreaktion bestimmt und schließlich konnte mit der Formel $c_{\text{Probe}} = \Delta A \times 1,192$ die Konzentration der freien Fettsäuren in mM berechnet werden. Der Koeffizient kann laut Herstellerangaben bei Einhaltung der

Messbedingungen mit einer Wellenlänge von 546 nm, einer Schichtdicke von 1 cm, einer Temperatur von 25 °C und den verwendeten Volumina übernommen werden.

5.3.4 Bestimmung des intrahepatischen Cholesterin-Gehalts

Zur Analyse des intrahepatischen Cholesterins wurde der Cholesterin CHOD-PAP Kit (Best. Nr. CHO 013, Diaglobal GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet, welcher ebenfalls ein enzymatischer Farbtest auf Grundlage der CHOD-PAP-Methode ist. Im Reaktionsablauf dieses Test werden zunächst Cholesterinester enzymatisch gespalten. Danach wird das freie Cholesterin mittels Cholesterinoxidase (CHOD) oxidiert und das hierbei gebildete H_2O_2 in einer Peroxidase- bzw. PAP-Reaktion in einen Farbstoff umgesetzt. Bei der Messung wurden 200 µl des Reagenz mit 4 µl des Lipid-Extrakt vermischt, was für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Innerhalb von 60 Minuten wurde dann die Probe gegen den Leerwert gemessen, was eine Extinktion E_{Probe} ergab. Als Leerwert diente das Lösungsmittel des Lipid-Pellets (siehe Beschreibung Herstellung des Lipid-Extrakts). Bei einer photometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 546 nm, einer Schichtdicke von 1 cm und Raumtemperatur errechnete sich die Cholesterin-Konzentration in mg/dl des Lipid-Extrakts aus der Formel $c_{Probe} = 454 \times E_{Probe}$, wobei der Faktor aus den Herstellerangaben übernommen wurde.

5.4 Anfertigung und Auswertung histologischer Leberschnitte

Zur Beurteilung der Entwicklung von Steatose, Inflammation und Fibrose im vorliegenden NASH-Tiermodell wurden Hämatoxylin/Eosin- und Sirius-Red-Färbungen von Paraffin-Schnitten des Lebergewebes angefertigt und nach dem Scoring-System von Kleiner et al. (2005) ausgewertet.

5.4.1 Anfertigung der Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Für die Hämatoxylin/Eosin-Färbung wurde Lebergewebe nach der Organentnahme zuerst für 24 Stunden in 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurde das fixierte Gewebe durch einen Automaten der Routine-Diagnostik im Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Regensburg in Ethanol-Lösungen aufsteigender Konzentration dehydriert und in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffin-Blöcken wurden im Mikrotom dann 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die zur weiteren Behandlung auf Glas-Objektträger aufgebracht wurden. Nachdem die Schnitte mittels Xylol deparaffinisiert worden waren,

wurde das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert und in eine wässrige Hämatoxylin-Lösung eingetaucht. Hämatoxylin bindet an basophile Strukturen wie die anionischen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren. Nach einer erneuten Dehydratation in Alkohol wurden die Objektträger in eine alkoholische Eosin-Lösung eingetaucht. Eosin wiederum ist negativ geladen und reagiert mit kationischen Gruppen, wie sie zum Beispiel auf Aminosäuren und anderen eosinophilen Strukturen zu finden sind. Die fertig gefärbten Schnitte wurden mit Deckgläschen eingedeckelt unter Verwendung des Entellan-Eindeckelmediums. In der so angefertigten H/E-Färbung färbt nun Eosin ganz allgemein Proteine pink bis rot und Hämatoxylin verleiht den basophilen, Nuklein-Säuren enthaltenden Strukturen, also dem Zellkern mit den Ribosomen und dem Chromatin, unter dem Mikroskop eine blaue bis lila Farbe.

5.4.2 Anfertigung der Sirius-Red-Färbung

Bis einschließlich zum Aufbringen auf Glas-Objektträger wurde exakt wie bei der Anfertigung der H/E-Schnitte verfahren. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol getaucht und durch eine absteigende Alkoholreihe rehydratisiert. Nach einer Waschung in 0,05 % PBS/Tween wurden die Objektträger für 30 Min. in einer 0,1 % Färbelösung belassen, bestehend aus 100 mg Siriusrot, 100 mg Fast Green und 100 ml Pikrinsäure, die verhindert, dass das Siriusrot an andere Komponenten als Kollagen bindet. Nach Abschluss der Färbung wurden die Schnitte mit Wasser abgespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und nach einem erneuten Bad in Xylol wie für die H/E-Schnitte beschrieben eingedeckelt. Als Ergebnis bindet Siriusrot an Kollagenfasern und färbt diese rot, die Gegenfärbung der zellulären Strukturen mittels Fast Green ergibt einen grünen Farbton.

5.4.3 Auswertung der gefärbten Schnitte: der NAFLD activity score (NAS)

Zur histologischen Begutachtung wurde das von Kleiner et al. (2005) entwickelte Scoring-System angewendet. Dabei werden die Einzelkomponenten der NASH beurteilt, ihnen ein nach Ausprägung des Merkmals graduierter Zahlenwert zugeordnet und die Einzelwerte zu dem sog. NAFLD activity score (NAS) aufaddiert. Beurteilt werden hierbei anhand von H/E-gefärbten Lebergewebsproben die Komponenten Steatose als Grad der hepatozytären Fetteinlagerung, Ballonierung als Marker für den Zellschaden und die lobuläre Inflammation als Kenngröße der begleitenden Steatohepatitis. Die hepatische Fibrosierung wird anhand einer Bindegewebsfärbung – in diesem Fall handelt es sich um eine Sirius-Red-Färbung –

beurteilt und eingeteilt, sie ist jedoch keine Komponente des NAS. Die einzelnen Größen werden folgendermaßen graduiert:

Tabelle 5: Gradeinteilung des NASH-Scoring-Systems

Im Rahmen der histologischen Begutachtung werden beurteilt: Steatose in Prozent der verfetteten Hepatozyten, die Ballonierung nach Menge der ballonierten Hepatozyten, die Inflammation nach Anzahl von Entzündungsfoci pro Gesichtsfeld (200-fache Vergrößerung), sowie die Fibrose nach ihrem Verteilungsmuster.

** Der Fibrosegrad 1 kann nochmals unterteilt werden in 1a: leichte Fibrose zentral/perisinusoidal, 1b: moderate Fibrose zentral/perisinusoidal, 1c: portale/periportale Fibrose*

	Steatose	Ballonierung	Inflammation	Fibrose
0	< 5 %	keine	keine	keine
1	5 % - 33 %	wenige	< 2 foci	perisinusoidal oder periportal *
2	34 % - 66 %	viele	2 -4 foci	perisinusoidal und periportal
3	> 66 %		> 4 foci	brückende Fibrose
4				Zirrhose

Der NAS kann somit Zahlenwerte von 0 – 8 annehmen. Die Werte 0 – 2 bedeuten dabei definitiv keine und die Werte 3 und 4 eine fragliche Steatohepatitis. Bei Summenwerten von ≥ 5 kann die Diagnose der Steatohepatitis definitiv gestellt werden.

Dieses von Kleiner et al. entwickelte System ist allgemein anerkannt und wurde ebenfalls von der deutschen Konsensusgruppe „Histopathologische Diagnose der nicht alkoholischen und alkoholischen Fettlebererkrankung“ übernommen (Tannapfel et al. 2010). Somit fand es auch Einzug in die deutschen Leitlinien.

5.5 Durchführung und Auswertung der Fluoreszenz-Immunhistochemie: Tyrosin-Hydroxylase-Färbung von Leber- und Darmgewebe

Zum Nachweis der erfolgreichen Sympathektomie wurde eine immunhistochemische Färbung von Dünndarmgewebe angefertigt. Hierbei wurden indirekt sympathische Nervenfasern angefärbt. Die Zielstruktur dieser Färbung ist das Enzym Tyrosin-Hydroxylase (TH), das Schlüsselenzym für die Produktion von Noradrenalin in sympathischen Nervenendigungen. Neben der Darstellung der TH-positiven Fasern im Dünndarmgewebe wurden auch TH-Färbungen von Lebergewebe angefertigt, zum Einen zur Beurteilung der Verteilung der sympathischen Nervenfasern in der Mausleber und v. a. ihrer Veränderung im Rahmen der NASH, zum Anderen zur Untersuchung des Einflusses der Sympathektomie auf intrahepatische sympathische Nervenfasern.

5.5.1 Präparation des Gewebes

Für die Immunhistochemie wurde jeweils ein Aliquot von Leber- und Darmgewebe nach der Organentnahme mit folgenden Schritten behandelt (Miller et al. 2000): Zuerst wurde das Gewebe in 3,7 % Formaldehyd in PBS für einen Tag fixiert, danach in PBS gewaschen und anschließend für 12 Stunden in 20 % Saccharose in PBS überführt. Zuletzt wurden die fixierten Leber- bzw. Darmstücke in Tissue-Tek eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten dann bei - 80 °C gelagert werden.

5.5.2 Durchführung der Tyrosin-Hydroxylase-Färbung

Vom fixierten und in Tissue-Tek eingebetteten Gewebe wurden im Kryotom 8 µm dicke Kryoschnitte angefertigt, wobei jeweils 3 Anschnitte auf 3 Objektträger übertragen wurden. 2 Objektträger wurden dabei für die TH-Färbung verwendet, der andere Objektträger diente als Negativ-Kontrolle. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte bei 4 °C eine Stunde lang getrocknet, woraufhin sie anschließend für 10 Minuten in PBS gewaschen wurden. Vor der Färbung mit dem Primärantikörper wurden die Schnitte mit einer Blocklösung behandelt, um eine unspezifischen Bindung des Primärantikörpers zu verhindern. Dafür wurde eine 3-fach-Blocklösung hergestellt, bestehend aus einem Teil FCS (Fetales Kälber-Serum), einem Teil goat-Serum und 8 Teilen 10 % BSA (Bovines Serum), gelöst in 0,3 % Triton in PBS. Von dieser Blocklösung wurden 30 – 200 µl je nach Schnittgröße auf jeden Schnitt gegeben, was 45 Minuten lang bei 4 °C inkubierte. Danach wurde die Blocklösung von den Schnitten

geschüttelt und die Objektträger wiederum für 10 Minuten in PBS gewaschen. Nach diesem Schritt erfolgte die Behandlung mit dem Primärantikörper rabbit-anti-rat Tyrosin-Hydroxylase (Millipore, cat. no. AB 152, Temecula, USA), der nach einer 1:500-Verdünnung mit 10 % goat-Serum in 1 % BSA auf jeden Schnitt pipettiert wurde. Auf die Negativ-Kontrollen wurde nur 10 % goat-Serum in 1 % BSA pipettiert. Der Primärantikörper inkubierte dann über Nacht, mindestens jedoch für 3 Stunden. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurde die Primärantikörperlösung von den Objektträgern geschüttelt, bevor die Schnitte zuerst für 5 Minuten in 0,3 % Triton in PBS und danach nochmals 5 Minuten in PBS gewaschen wurden. Die Negativ-Kontrollen wurden ab dem Aufbringen des Primärantikörpers jeweils in separaten Behältnissen gewaschen, um eine Verunreinigung durch den Antikörper zu vermeiden. Als nächstes wurde der Sekundärantikörper, ein goat-anti-rabbit IgG Antikörper, gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) und der ursprünglichen Konzentration von 2 mg/ml 1:500 in 10 % goat-Serum in 1 % BSA verdünnt und anschließend bis zur vollständigen Bedeckung auf alle Schnitte pipettiert, d. h. auch auf die Negativ-Kontrollen. Ab diesem Zeitpunkt wurde bei Dunkelheit gearbeitet, um eine allzu schnelle Abschwächung der Leuchtkraft des Fluoreszenzfarbstoffs zu vermeiden. Nachdem die Schnitte dann 90 Minuten mit dem Sekundärantikörper inkubiert worden waren, schloss sich wiederum eine Waschung für jeweils 5 Minuten erst in 0,3 % Triton in PBS und im Anschluss in PBS an. Zusätzlich wurde anschließend noch eine DAPI-Färbung durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich an Adenin/Thymin-reiche Regionen der DNA anlagert und somit die Kerne anfärbt, die im Fluoreszenzmikroskop dann hellblau erscheinen. Hierfür wurden 2 µl der DAPI-Lösung in eine mit PBS befüllte Glasküvette pipettiert und die Schnitte 45 Sekunden darin eingetaucht. Zuletzt wurden auf die noch feuchten Objektträger 3 Tropfen DAKO fluorescent mounting medium aufgebracht, um die Schnitte dann mit Deckgläschen einzudeckeln. Die Schnitte wurden bis zur Auswertung maximal 4 Wochen nach dem Zeitpunkt der Färbung bei 4 °C gelagert.

5.5.3 Nachweis der erfolgreichen Sympathektomie

Der Nachweis der Sympathektomie erfolgte wie durch Straub et al. beschrieben (Straub et al. 2008) und erfolgte anhand von TH-gefärbten Dünndarmschnitten. Es wurden die angefärbten sympathischen Nervenfasern in 17 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern bei

einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt. Aus den Zahlenwerten der 17 einzelnen Gesichtsfelder wurde der Mittelwert ermittelt und dieser dann mit 3,3 multipliziert, was in etwa einer Näherung für die Anzahl der Nervenfasern pro Quadratmillimeter entspricht.

5.5.4 Auswertung der intrahepatischen sympathischen Innervation

Bei der Beurteilung der Verteilung der sympathischen Nervenfasern innerhalb der Leber stellten wir fest, dass sich die TH-positiven Fasern nur im Bereich der Portalfelder um die interlobulären Äste von Portalvene und Leberarterie herum nachweisen ließen, womit wir Voruntersuchungen, die besagen, dass sich in der Mausleber die sympathischen Nervenfasern bis in die Portalfelder aufteilen, nicht aber in die Sinusoide bzw. in den Bereich der Zentralvenen einstrahlen, bestätigen konnten (Moghimzadeh et al. 1983). Da uns deswegen eine zufällige Auswahl von Gesichtsfeldern nicht möglich bzw. sinnvoll erschien, entschlossen wir uns, bei einem Licht der Kontrollwellenlänge, die den roten Fluoreszenzfarbstoff nicht anregt, bei der jedoch die Gewebsstruktur erkannt werden kann, Portalfelder aufzusuchen, dann das Licht der den roten Farbstoff anregenden Wellenlänge einzuschwenken und so die blind ausgewählten Portalfelder auf das Vorhandensein von rot leuchtenden sympathischen Nervenfasern zu untersuchen. So wurden pro Versuchstier 15 Portalfelder aufgesucht und semiquantitativ nach folgendem Scoring-System ausgewertet: 0 = keine TH-positiven Nervenfasern zu erkennen; 1 = einzelne TH-positive Nervenfasern sichtbar; 2 = viele TH-positiven Nervenfasern im Portalfeld. Aus den 15 Einzelwerten wurde dann ein Mittelwert berechnet.

Tabelle 6: TH-Scoring der Leber, Abstufung der Zahlenwerte

0	keine TH- positiven Nervenfasern
1	einzelne
2	viele

5.6 RNA-Isolation und –Analyse

5.6.1 Isolation der RNA

Zur Isolation der gesamten RNA wurde der RNeasy® mini kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) unter Befolgung der Angaben des Herstellers verwendet. Zuerst wurde ein Aliquot Lebergewebe mittels des MICCRA D-1 Homogenisators (ART Prozess- & Labortechnik,

Mühlheim, Deutschland) in Anwesenheit eines Guanidin-Isothiocyanat enthaltenden Lyse-Puffers (RLT-Puffer) homogenisiert. Außerdem wurde dem Puffer β -Mercaptoethanol zugefügt, um vorhandene RNAsen sofort zu inaktivieren. Anschließend wurde das Homogenat zur weiteren Zerkleinerung in Schredder-Säulen überführt. Der Durchfluss wurde dann in Säulen gegeben, die hydrophile Silikon-Membranen enthalten, an die die RNA in Anwesenheit der passenden Puffersysteme binden kann. Damit die RNA an die Membranen binden kann, wurde Ethanol enthaltender Puffer zugefügt. Nach mehreren Waschschritten wurde die im Versuchsansatz vorhandene DNA durch die Inkubation mit DNase (Qiagen, Hilden, Deutschland) entfernt. Nach weiteren Waschschritten wurde die RNA aus den Säulen ausgewaschen unter Verwendung von RNase freiem Wasser (DEPC-Wasser). Anschließend konnte die RNA-Konzentration mittels NanoDrop® ND-1000 UV/VIS Spektrophotometer (Peqlab, Erlangen, Deutschland) gemessen werden.

5.6.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Die Transkription von RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde unter Verwendung des Reverse Transcription System Kit (Promega, Mannheim, Deutschland) durchgeführt, der die reverse Transkriptase des aviären Myeloblastose-Virus (AMV) enthält. Die folgenden Komponenten wurden zu einem Master-Mix zusammenpipettiert:

Tabelle 7: Zusammensetzung des Master-Mixes zur reversen Transkription

4 μ l $MgCl_2$ (25 mM)
2 μ l 10x Reverse-Transkription-Puffer
2 μ l dNTP Mix (10 mM)
1 μ l random primer
0.5 μ l RNasin (Ribonuklease-Inhibitor)
0.6 μ l AMV Reverse Transkriptase

1 μ g der zuvor isolierten RNA wurde dann mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 12 μ l verdünnt und mit 10,1 μ l des Master-Mix vermischt. Für die reverse Transkription wurden die Proben für 30 Min. bei 42 °C im GeneAmp® PCRCycler inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurde die Temperatur zur Denaturierung der AMV RT auf 99 °C gesteigert. Zuletzt wurde das System auf 4 °C abgekühlt und die erzeugte cDNA konnte mit H_2O dest. auf ein Volumen von 100 μ l verdünnt und bei – 20 °C gelagert werden.

5.6.3 Quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR) wurde durchgeführt, um die Expression spezifischer mRNA zu messen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM® 7900 HT Sequence detection system in Verbindung mit der korrespondierenden SDS 2.3 Software zur Analyse der Ergebnisse. Als fluoreszierendes Reagens wurde SYBR® Green (QuantiTect SYBR® Green PCR Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) eingesetzt. Zusätzlich zu einer konventionellen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bietet dieses System die Möglichkeit der Quantifizierung der entstandenen RNA, was durch eine Fluoreszenz-Messung am Ende und/oder während eines PCR-Zyklus erreicht werden kann. Der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR® Green interkaliert dabei mit Doppelstrang-DNA, sodass das Fluoreszenz-Signal proportional zu der Menge an erzeugtem PCR-Produkt ansteigt. Um die Expression eines spezifischen Gens zu quantifizieren, wurde die Δ CT-Methode angewendet. Der CT-Wert (cycle threshold = Zyklus Schwellenwert) bezeichnet den Beginn der exponentiellen Phase der Reaktion, also den Punkt, an dem das Fluoreszenz-Signal der Probe über den Schwellenwert hinaus ansteigt. Mit dieser Methode wurde die x-fache Expression eines bestimmten Gens berechnet in Relation zu einer Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde (Kalibrator). Als housekeeper wurde 18s verwendet, ein Gen, das konstant exprimiert wird.

Berechnung des Expressionsgrades:

Schritt 1: Normalisierung auf den housekeeper (18s RNA):

$$\mathbf{CT_{Gen} - CT_{housekeeper} = \Delta CT_{Probe}}$$

Schritt 2: Normalisierung auf den Kalibrator:

$$\mathbf{\Delta CT_{Probe} - \Delta CT_{Calibrator} = \Delta \Delta CT}$$

Schritt 3: Berechnung der x-fachen Expression:

$$\mathbf{x\text{-fache Expression} = 2^{(-\Delta \Delta CT)}}$$

Tabelle 8: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsmixes

Collagen-1	TNF
2.5 µl DEPC-H ₂ O	
0.25 µl Vorwärts-Primer (20 µM)	1 µl QIAGEN QuantiTect Primer Assay
0.25 µl Rückwärts- Primer (20 µM)	
5 µl SYBR® Green	
PCR Master-Mix	
2 µl cDNA	

Die PCR-Reaktion erfolgte nach folgendem Programmablauf:

50 °C 2 min

95 °C 15 min

95 °C 15 s	x 45 Zyklen
55°C - 60°C 20 s	
72 °C 25 s	

Schmelzkurve:

60 °C bis 94°C, 0.1 °C/s

Die Fluoreszenz wurde nach Ende jedes Elongationsschrittes gemessen (72 °C), sowie kontinuierlich während der Bestimmung der Schmelzkurve zur Analyse der amplifizierten DNA.

Folgende Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer wurden verwendet:

Tabelle 9: Verwendete Primer

Collagen-1 vorwärts	5'-CGG GCA GGA CTT GGG TA
Collagen-1 rückwärts	5'-CGG AAT CTG AAT GGT CTG ACT
TNF vorwärts und rückwärts	QIAGEN QuantiTect Primer Assay

Die Primer wurden synthetisiert von SIGMA Genosys (Hamburg, Deutschland) bzw. bestellt als QIAGEN QuantiTect Primer Assay von Qiagen (Hilden, Deutschland)

5.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden in Mittelwerten \pm Standardabweichung angegeben. Für die Analyse wurde ein gepaarter bzw. ungepaarter T-Test gewählt. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Als Statistikprogramm wurde SPSS Version 16.0 verwendet.

6. Ergebnisse

6.1 Makroskopische Befunde

6.1.1 Gewichtsverlauf

Zu Beginn des Versuches hatten alle 4 Versuchsgruppen vergleichbare Körpergewichte: Kon (n = 6) $18,45 \pm 0,65$ g; Sx (n = 12) $18,19 \pm 0,48$ g; Paigen (n = 12) $17,59 \pm 0,61$ g; Paigen + Sx (n = 12) $17,43 \pm 0,50$ g.

Im Verlauf des Versuchs starben in der Gruppe Sx 6 Tiere und in der Gruppe Paigen + Sx 3 Tiere, sodass am Ende des Experiments nach 24 Wochen die jeweiligen Gruppen noch aus folgender Anzahl von Mäusen bestanden: Kon n = 6; Sx n = 6; Paigen n = 12; Paigen + Sx n = 9.

Zum Zeitpunkt der Organentnahme und nach einer Nüchtern-Periode von mindestens 12 Stunden hatten die Paigen-gefütterten Gruppen mit $22,59 \pm 1,20$ g (Paigen) bzw. $23,82 \pm 3,02$ g (Paigen + Sx) ein tendenziell höheres mittleres Körpergewicht gegenüber ihren Vergleichsgruppen mit $21,45 \pm 1,27$ g (Kon) bzw. $20,89 \pm 1,21$ g (Sx), wobei nur im Vergleich von Sx zu Paigen + Sx ein signifikanter Unterschied des Körpergewichts nachgewiesen werden konnte ($p < 0,05$). Die Sympathektomie wirkte sich nicht signifikant auf das Gewicht aus. Das relativ hohe mittlere Körpergewicht und die große Standardabweichung in der Gruppe Paigen + Sx erklärt sich hierbei durch eine massive intraabdominelle Flüssigkeitsansammlung weißlicher bis leicht rötlich blutiger Farbe bei 4 Tieren in dieser Gruppe. Bei 4 weiteren Tieren in dieser Gruppe konnte im Vergleich zu den vorher beschriebenen Mengen eine kleinere Menge klarer bis leicht blutiger Flüssigkeit gefunden werden. Bei lediglich einem Tier in der Gruppe Paigen + Sx war keine intraabdominelle Flüssigkeit sichtbar. Auch bei sämtlichen Tieren aus den anderen Gruppen war keine intraabdominelle Flüssigkeitsansammlung feststellbar, bis auf ein Tier aus der Gruppe Sx mit mittlerer Menge klarer Flüssigkeit.

6.1.2 Leber und Milz

Bei der Organentnahme imponierten die Lebern der Tiere aus der Paigen-Gruppe vergrößert, das Gewebe zeigte einen aufgehellten, verfetteten Aspekt. Die Lebern der Tiere aus den beiden sympathektomierten Gruppen fielen durch ein knotiges, vernarbtes Aussehen auf mit

abgerundeten Leberädern, wobei die Lebern aus der Gruppe Paigen + Sx zudem vergrößert waren. Diese sichtbaren Größenunterschieden schlugen sich auch auf das Gewicht der Lebern aus, wobei die durchschnittlichen Lebergewichte in den Gruppen Paigen und Paigen + Sx mit 1850 ± 200 mg bzw. 1630 ± 330 mg sowie in den Gruppen Kon und Sx mit 990 ± 90 mg bzw. 870 ± 40 mg jeweils vergleichbar waren. Die Paigen-Fütterung wirkte sich somit in einem signifikant erhöhten Lebergewicht aus ($p < 0,001$), wobei sich die Masse der Lebern in den Paigen-Gruppen im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen fast verdoppelte. Die Sympathektomie bewirkte hingegen unter Paigen-Fütterung keinen signifikanten Einfluss auf das Lebergewicht.

Analog zum Lebergewicht war auch das mittlere Milzgewicht in den Gruppen Kon und Sx mit 100 ± 10 mg bzw. 110 ± 30 mg vergleichbar. Durch Paigen-Fütterung (Paigen 190 ± 50 mg) konnte ein signifikant erhöhtes Milzgewicht erzielt werden (Kon vs. Paigen, $p < 0,001$), ohne dass die Sympathektomie das Milzgewicht signifikant beeinflusst hätte, mit einem mittleren Milzgewicht von 150 ± 60 mg in der Gruppe Paigen + Sx.

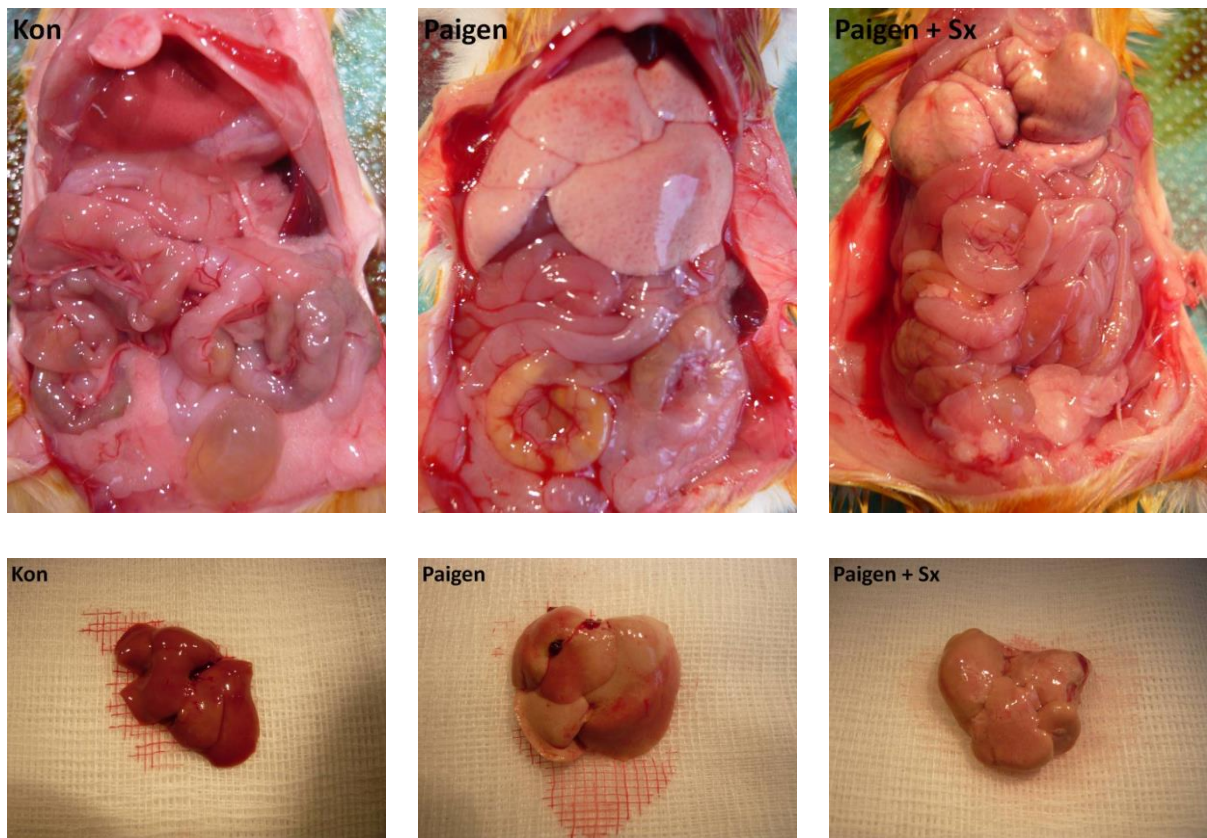


Abbildung 1: Makroskopischer Befund bei Organentnahme

Situs (oben), Lebern (unten); vergrößerte und aufgehellte Lebern bei Paigen und Paigen + Sx; knotige Veränderungen und abgerundete Leberränder bei Paigen + Sx

6.2 Mikroskopische Befunde

6.2.1 NASH-Scoring anhand histologischer Schnitte

Im Rahmen der histopathologischen Begutachtung zeigte sich innerhalb der Behandlungsgruppen ein sehr homogenes Bild, sodass es zwischen den Tieren in jeweils einer Gruppe interindividuell keine histomorphologischen Unterschiede zu erkennen gab.

So zeigten die Tiere der Kontrollgruppe (Kon), wie auch die Tiere aus der Sympathektomie-Kontrollgruppe (Sx) ein sehr uniformes Bild. Beruft man sich auf den NAS Score (NASH activity score), so ergab sich für die einzelnen Parameter Steatose, Ballonierung, Inflammation und Fibrose jeweils bei allen Tieren der beiden Gruppen der Wert „0“. Der NAS in diesen beiden Gruppen war somit jeweils 0. Insgesamt waren in den Gruppen Kon und Sx also keine Anzeichen für NASH-typische Veränderungen zu sehen.

Analog zu den Kontrollgruppen zeigten die Gruppen mit Paigen-Fütterung (Paigen und Paigen + Sx) ebenfalls ein sehr uniformes Bild. Die Tiere mit Sympathektomie und jene ohne waren histomorphologisch nicht zu unterscheiden. Die Sympathektomie blieb also ohne einen mikroskopisch fassbaren Effekt, wohingegen jedoch die Paigen-Fütterung ihren gewünschten Effekt erzielte, nämlich die Erzeugung einer Steatohepatitis. So ergab sich bei allen Tieren ein Steatosegrad von über 66 %, entsprechend einem Score-Wert von 3, eine stark ausgeprägte Ballonierung vieler Hepatozyten, also einen Ballonierungsgrad vom Wert 2, sowie eine gering ausgeprägte, jedoch feststellbare Inflammation mit einzelnen intralobulären Entzündungszellen, entsprechend einem NAS-Wert für die Inflammation von 1. Fasst man alle drei Parameter zusammen, ergibt sich also ein NAS-Summenwert von 6, was für die Diagnose einer NASH spricht.

Ebenfalls nachzuweisen war in der Sirius-Red-Färbung, einer speziellen Bindegewebsfärbung, eine diffuse perizelluläre sinusoidale Faservermehrung, d. h. eine Fibrose vom Grad 1a bis 1b.

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass das Tiermodell erfolgreich eine NASH mit Vorhandensein aller pathologischen NASH-Kriterien simulieren konnte, ohne dass die Sympathektomie einen histopathologisch fassbaren Effekt bewirken konnte.

Tabelle 10: Ergebnis der histopathologischen Untersuchung gefärbter Leberschnitte anhand des NAS-Scores nach Kleiner et al.

Summenwert des NAS von 6 und somit Diagnose der NASH in den Gruppen Paigen und Paigen + Sx; kein histomorphologischer Effekt durch Sympathektomie.

	Steatose	Ballonierung	Inflammation	Σ = NAS	Fibrose
Kon	0	0	0	0	0
Sx	0	0	0	0	0
Paigen	3	2	1	6	1 a/b
Paigen + Sx	3	2	1	6	1 a/b

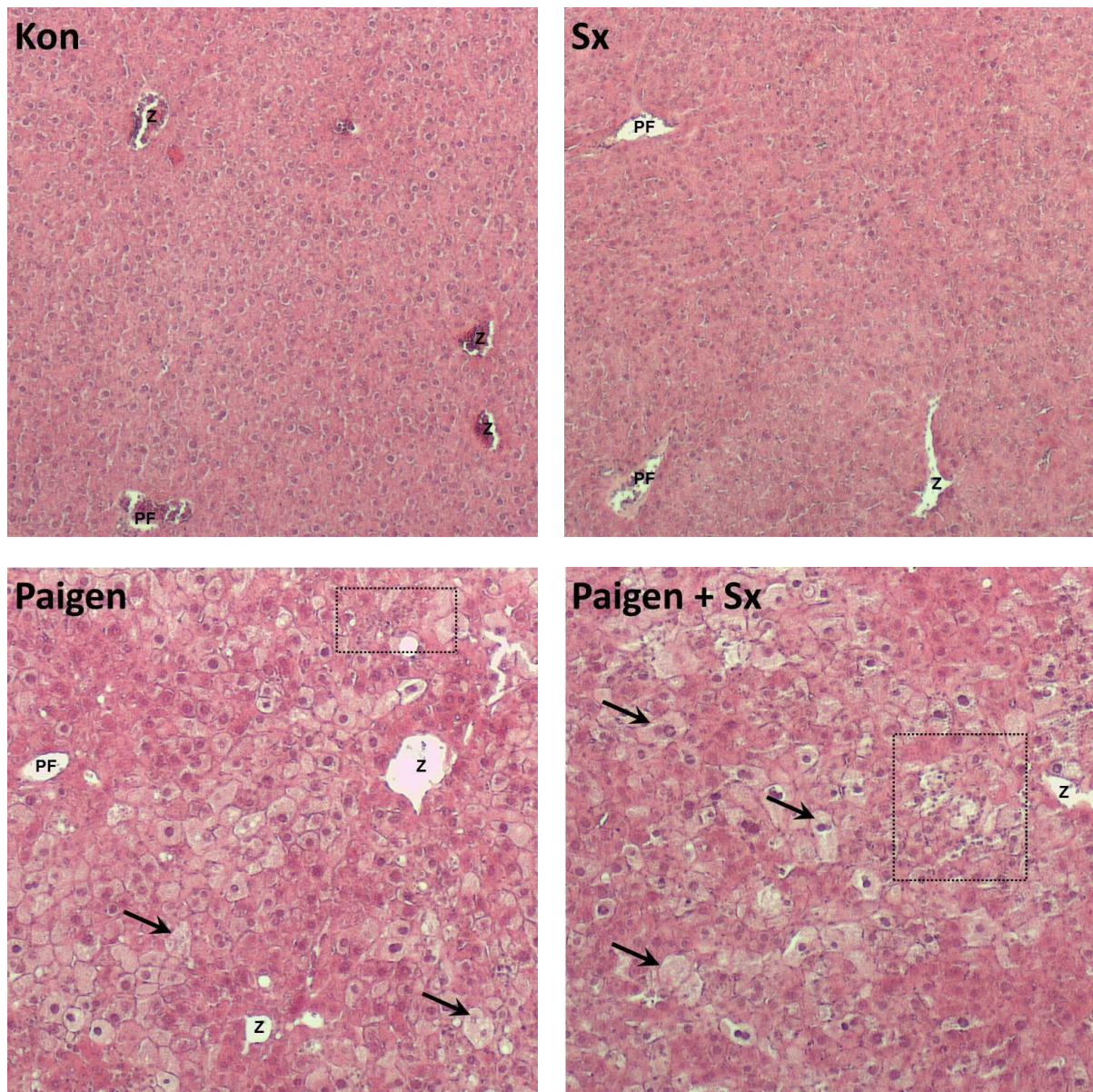


Abbildung 2: Histologischer Befund H/E-gefärbter Leberschnitte

Im Vergleich zu Kontrolltieren (Kon bzw. Sx) ausgeprägte Steatose, sowie Ballonierung (Pfeile) und Entzündungszellinfiltrate (gestrichelte Kästchen) in den Paigen-gefütterten Tiergruppen (Paigen und Paigen + Sx) als histopathologische Zeichen der NASH zu sehen; kein histomorphologisch fassbarer Effekt durch Sympathektomie feststellbar, sowohl im Vergleich von Kon zu Sx, als auch Paigen zu Paigen + Sx; Z: Zentralvene, PF: Portalfeld (Vergrößerung 40-fach).

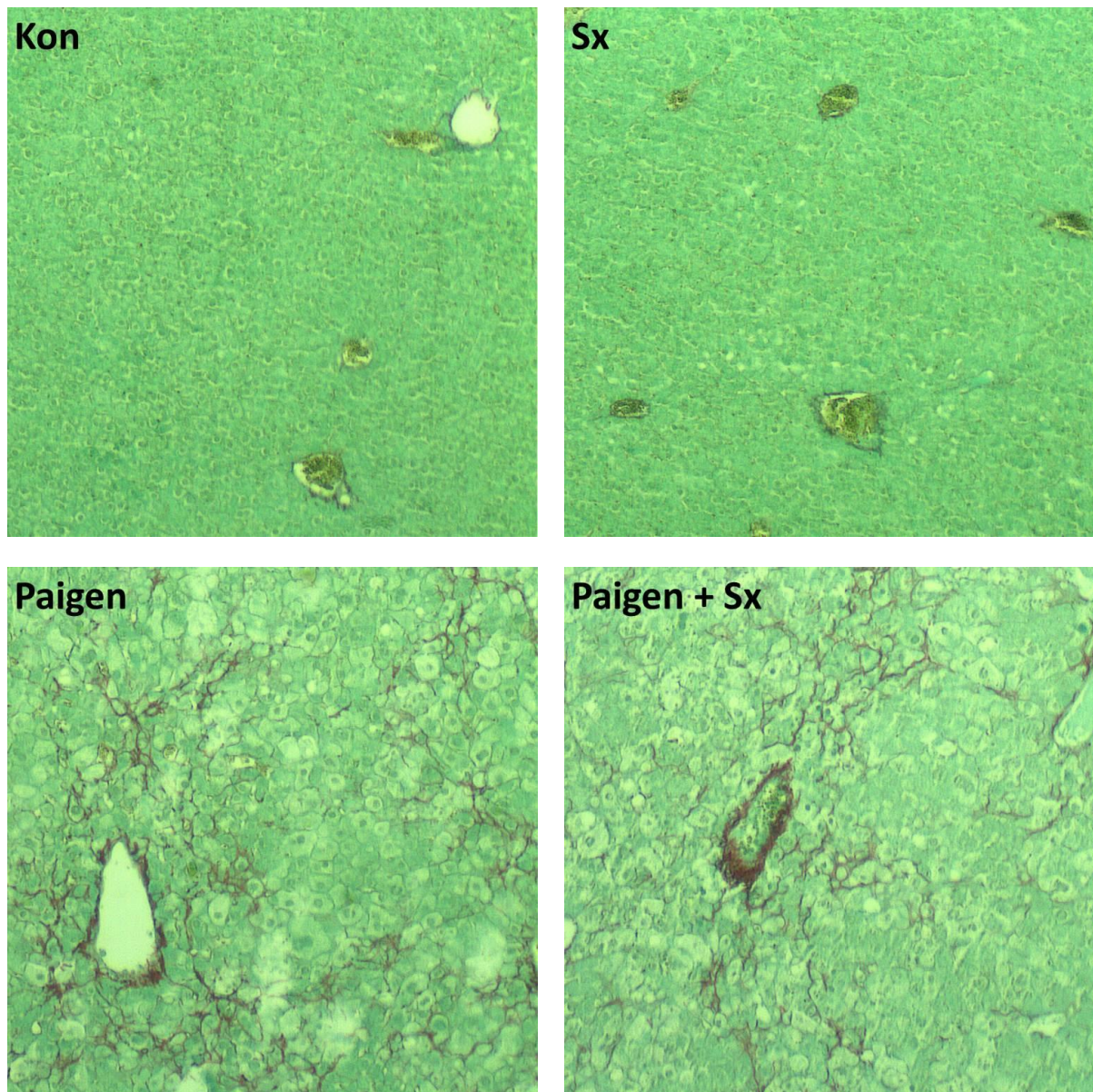


Abbildung 3: Histologischer Befund Sirius-Red-gefärbter Leberschnitte

Keine vermehrte Fibrosierung in den Gruppen Kon und Sx, deutliche diffuse perizelluläre sinusoidale Faservermehrung nach Paigen-Fütterung erkennbar, jedoch kein Unterschied nach Sympathektomie (Vergrößerung 40-fach).

6.3 Intrahepatischer Lipidgehalt

6.3.1 Freie Fettsäuren (ffA) und Triglyceride (TG)

Bei der Analyse von Lebergewebeproben auf den Gehalt an freien Fettsäuren (ffA) und Triglyceriden (TG) konnte jeweils kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, sowohl im Vergleich von Kontrollen (Kon bzw. Sx) zu Paigen-Fütterung (Paigen bzw. Paigen + Sx), als auch im Vergleich von Tieren ohne (Paigen bzw. Kon) und mit (Paigen + Sx bzw. Sx) Sympathektomie. Die Werte sind angegeben als Stoffmenge ffA bzw. Masseneinheit TG pro Masseneinheit Lebergewebe.

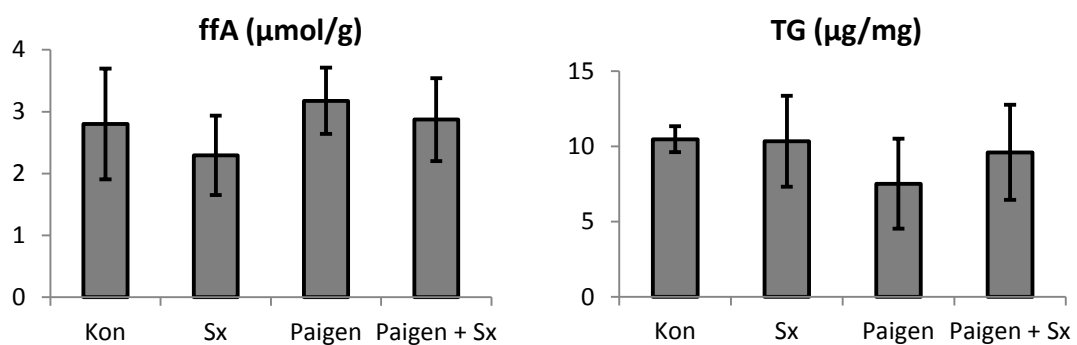


Abbildung 4: Intrahepatischer Gehalt an freien Fettsäuren (ffA) und Triglyceriden (TG)

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar.

6.3.2 Cholesterin

Im Gegensatz zu den freien Fettsäuren und Triglyceriden war der Cholesteringehalt im Lebergewebe signifikant erhöht. Zum einen lagerten die Tiere in der Paigen-Gruppe ($1,30 \pm 0,36 \mu\text{g/mg}$) signifikant mehr Cholesterin im Lebergewebe ein im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Kon: $0,19 \pm 0,05 \mu\text{g/mg}$; $p < 0,05$). Durch die Sympathektomie konnte der Cholesteringehalt in der Gruppe Paigen + Sx ($2,36 \pm 0,21 \mu\text{g/mg}$) nochmal im Vergleich zu den Tieren mit Paigen-Fütterung aber ohne Sympathektomie signifikant gesteigert werden ($p < 0,05$). Aus Vorversuchen ist bekannt, dass im Paigen-NASH-Tiermodell Cholesterin das vorherrschende in der Leber akkumulierende Lipid ist (Dorn 2009), was somit bestätigt werden konnte.

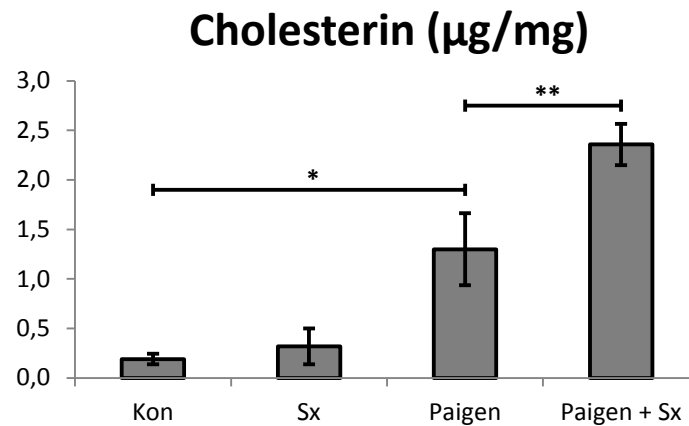


Abbildung 5: Intrahepatischer Cholesterin-Gehalt

Erhöhte intrahepatische Cholesterin-Konzentration durch Paigen-Fütterung (Kon vs. Paigen, * $p < 0,001$) und weitere Steigerung durch Sympathektomie (Paigen vs. Paigen + Sx, ** $p < 0,001$).

6.4 Transaminasen im Serum: AST und ALT

Als Marker für die Leberzellschädigung wurden die Transaminasen AST (bzw. GOT) und ALT (bzw. GPT) im Serum analysiert. Bei NASH sind charakteristischerweise v. a. die ALT-Werte erhöht, sodass die Serum AST/ALT-ratio typischerweise erniedrigt ist, anders als bei der alkoholischen Fettlebererkrankung, bei der dieses Verhältnis eher erhöht ist (Powell 1990, Diehl 1988). Auch im vorliegenden Paigen-Diät-induzierten NASH-Tiermodell konnte eine durch die Paigen-Fütterung erzielte signifikante Erhöhung der ALT-Werte festgestellt werden im Vergleich zu den Kontrolltieren (Paigen: 402 ± 73 vs. Kon 100 ± 28 ; $p < 0,001$). Durch die Sympathektomie konnte der ALT-Wert signifikant gesenkt werden (Paigen 402 ± 73 vs. Paigen + Sx: 306 ± 104 ; $p < 0,05$). Die AST-Werte waren bei den Paigen-gefütterten Tieren tendenziell erhöht, der Unterschied konnte jedoch keine Signifikanz erreichen.

Beim Vergleich der AST- mit den ALT-Werten im Rahmen der Berechnung von AST/ALT-ratios konnte die für NASH typische Erniedrigung des AST/ALT-Verhältnisses nachvollzogen werden (Kon: $4,7 \pm 1,5$ vs. Paigen: $1,6 \pm 0,8$, $p < 0,05$); die Sympathektomie konnte das Verhältnis jedoch nicht beeinflussen (Paigen + Sx: $1,8 \pm 0,8$).

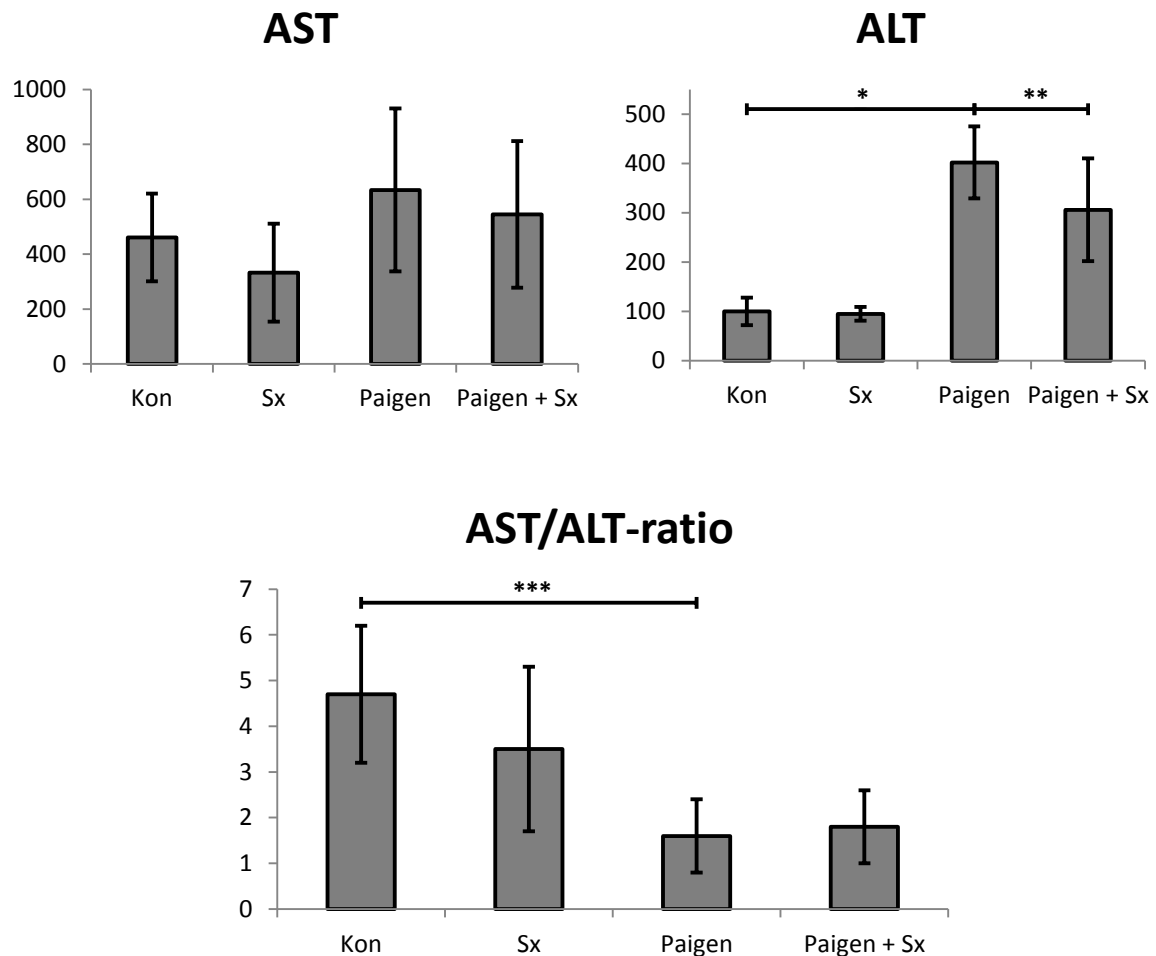


Abbildung 6: Transaminasen AST und ALT im Serum, AST/ALT-ratio

Keine signifikanten Unterschiede der AST Werte; signifikante Erhöhung der ALT-Werte unter Paigen-Fütterung (Kon vs. Paigen, * $p < 0,001$) und signifikante Erniedrigung durch Sympathektomie (Paigen vs. Paigen + Sx, ** $p < 0,05$); Erniedrigung der AST/ALT-ratio bei NASH (Kon vs. Paigen, *** $p < 0,01$), die Sympathektomie blieb ohne signifikanten Effekt.

6.5 Ergebnisse der RNA-Untersuchungen: TNF und Collagen-1

6.5.1 TNF

Als Parameter zur Abschätzung der hepatischen Inflammation im Rahmen der NASH wurde die Aktivität des Zytokins TNF im Lebergewebe mittels quantitativer PCR untersucht. TNF gilt als einer der Schlüssel-Mediatoren in der Pathophysiologie der hepatischen Entzündungsreaktion im Rahmen der NASH (Tomita et al. 2006).

Auch durch das vorliegende Experiment kann der Stellenwert von TNF bei der NASH unterstrichen werden. So zeigt sich bei den Paigen-gefütterten Tieren eine deutliche Überexpression von TNF (Paigen: $11,71 \pm 1,92$ vs. Kon: $1,00 \pm 0,58$; $p < 0,001$). Durch die Sympathektomie konnte diese gesteigerte Expression von TNF jedoch nicht beeinflusst werden (Paigen + Sx: $11,10 \pm 5,06$).

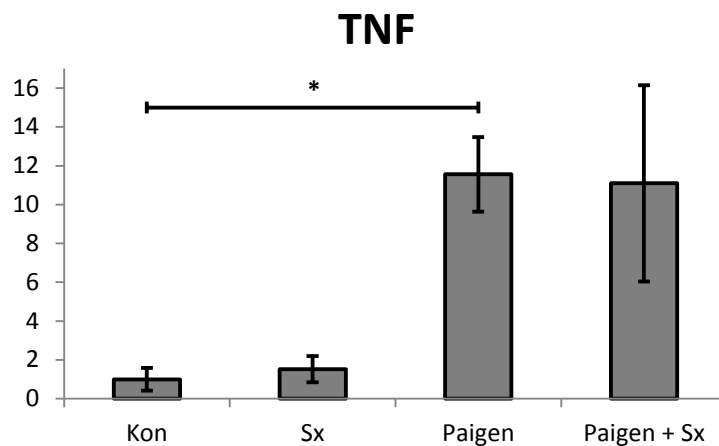


Abbildung 7: Expression von TNF im Lebergewebe

Gesteigerte Expression von TNF im Rahmen der NASH ($p < 0,001$), keine signifikante Änderung durch Sympathektomie.*

6.5.2 Collagen-1

Desweiteren wurde zur Messung der hepatischen Fibrosierungsvorgänge die Aktivität von Collagen-1 im Lebergewebe bestimmt. Während eines chronischen Leberzellschadens ist die Expression der Collagene I, II und IV erhöht, wobei Collagen I das prädominierende Molekül darstellt (Burt et al. 1990, Hahn et al. 1980, Rojkind et al. 1979).

Diesen Anstieg der Genaktivität von Collagen-1 konnten auch wir in unserem NASH-Tiermodell bestätigen. Die Expression war in der Paigen-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (Paigen: $2,57 \pm 0,85$ vs. Kon: $1,00 \pm 0,63$; $p < 0,01$). Auch hinsichtlich Collagen-1 zeigte sich jedoch durch die Sympathektomie kein Effekt (Paigen + Sx: $3,09 \pm 0,57$).

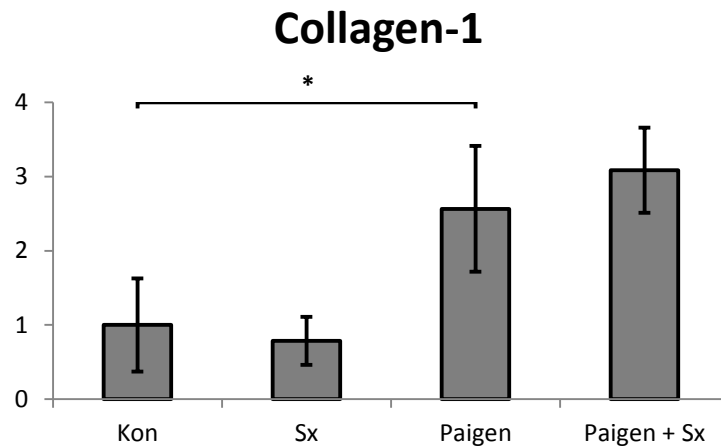


Abbildung 8: Expression Collagen-1 im Lebergewebe

Gesteigerte Expression von Collagen-1 im Rahmen der NASH ($p < 0,01$), keine signifikante Änderung durch Sympathektomie.*

6.6 Fluoreszenz-Immunhistochemie

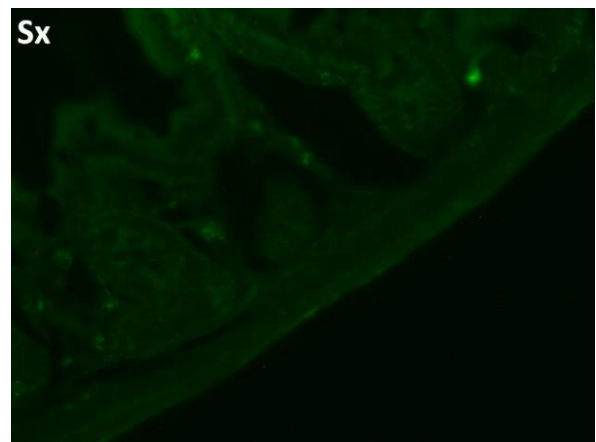
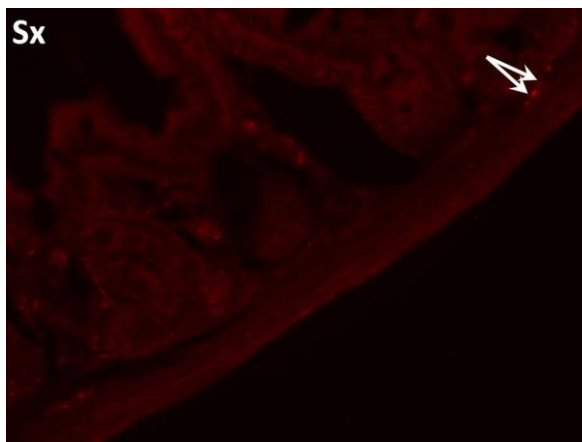
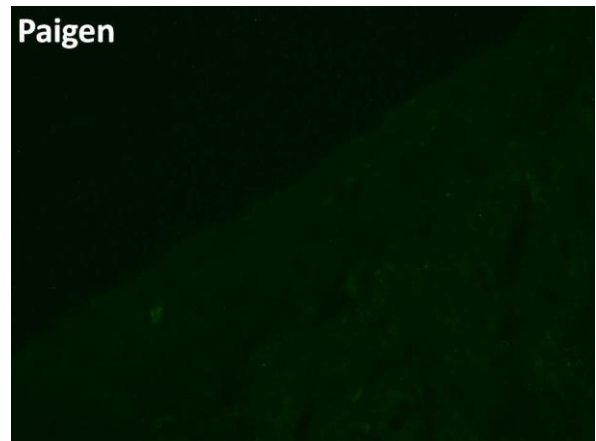
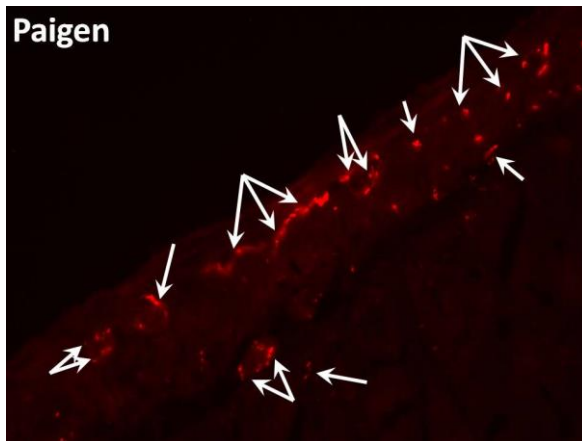
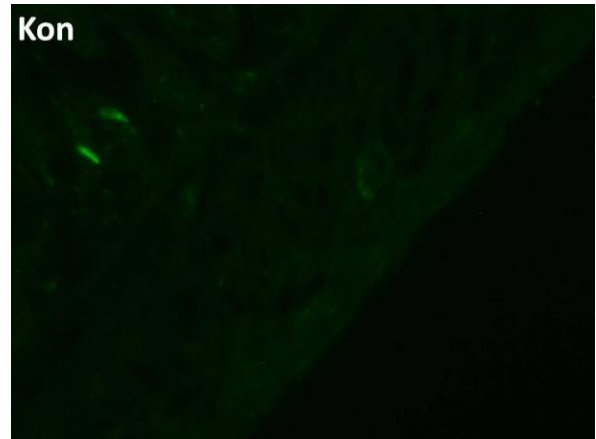
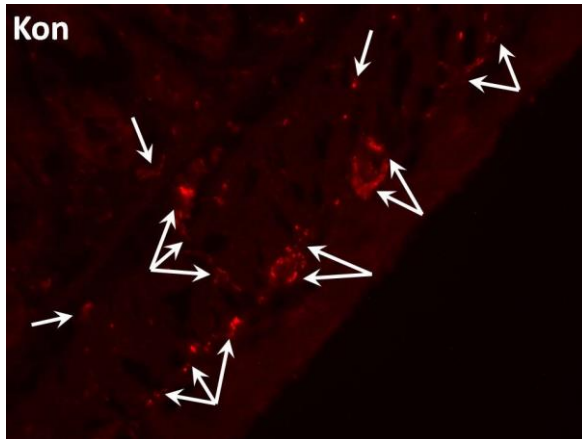
6.6.1 Nachweis der erfolgreichen Sympathektomie anhand TH-gefärbter Dünndarmschnitte

Zum Nachweis der erfolgreichen Sympathektomie wurden sympathische, Tyrosin-Hydroxylase (TH) enthaltende Nervenfasern wie im Methodenteil beschrieben mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper markiert, sodass diese im Fluoreszenzmikroskop rot leuchteten. Der Nachweis erfolgte anhand der Auszählung der TH-positiven Nervenfasern in Dünndarmschnitten.

Schon in der Überblicksbetrachtung fiel auf, dass sich die Anzahl der sympathischen, TH-positiven Fasern, die sich im Dünndarm v. a. in der Tunica muscularis anfärbten, in den sympathektomierten Gruppen Sx und Paigen + Sx stark reduziert hatte. Während in den Gruppen Kon und Paigen die Nervenfasern zahlreich v. a. im Bereich der Tunica muscularis und teilweise in tiefere Schleimhautschichten einstrahlend zu sehen waren, konnten in den Gruppen Sx und Paigen + Sx nur wenige Nervenfasern identifiziert werden.

Bei der Auszählung der sympathischen Nervenfasern pro Quadratmillimeter zeigte sich beim Vergleich von Kon zu Sx sowie von Paigen zu Paigen + Sx eine signifikante, ca. 80 % betragende Reduktion (Kon: $35,3 \pm 2,7$ vs. Sx: $7,6 \pm 0,3$, $p < 0,05$; Paigen: $34,6 \pm 1,0$ vs. Paigen

+ Sx: $6,3 \pm 0,4$, $p < 0,05$). Die Paigen-Fütterung alleine hatte keinen Einfluss auf die Dichte der intestinalen sympathischen Innervation: im Vergleich von Kon zu Paigen bzw. Sx zu Paigen + Sx stellte sich kein signifikanter Unterschied heraus.



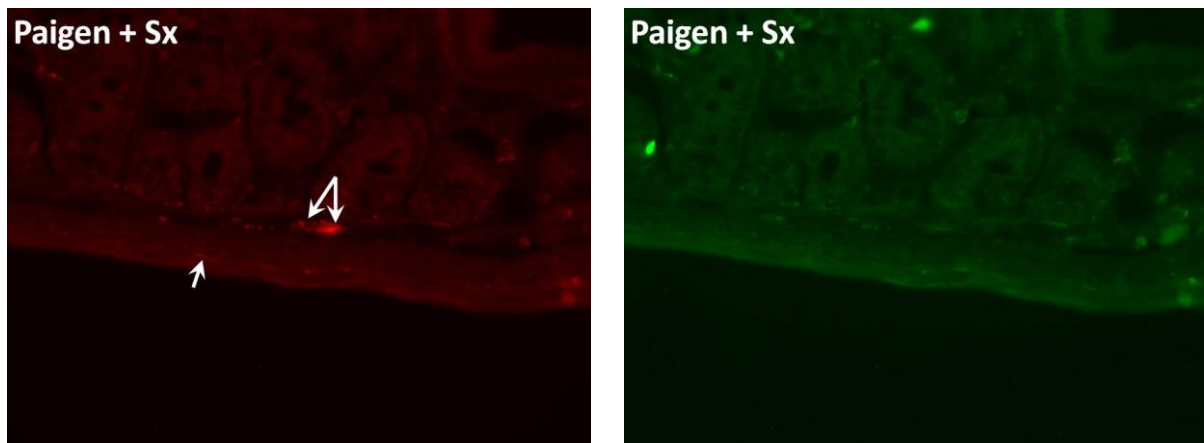


Abbildung 9: TH-Färbung Dünndarm

Nachweis der erfolgreichen Sympathektomie anhand TH-gefärbter Dünndarmschnitte; je ein repräsentatives Beispiel aus jeder Gruppe (rot, links) mit dazugehöriger Kontroll-Färbung (grün, rechts); TH-positive Nervenfasern (Pfeile) v. a. in der Tunica muscularis; sichtbare Verringerung in den sympathektomierten Gruppen.

6.6.2 Veränderung der intrahepatischen sympathischen Innervation im Rahmen der NASH und Einfluss der chemischen Sympathektomie

Zur Untersuchung der intrahepatischen sympathischen Innervation im Rahmen der NASH und des Einflusses der Sympathektomie auf dieselbe wurden analog zur TH-Färbung von Dünndarmschnitten Leberschnitte mit einem für TH spezifischen Fluoreszenzantikörper angefärbt. Die Auswertung erfolgte nach dem im Methodenteil beschriebenen Scoring-System: der Wert „2“ galt hierbei für viele TH-positive Nervenfasern im Bereich eines beurteilten Portalfeldes; der Wert „1“ wurde bei sehr wenigen, aber nachweisbaren Nervenfasern vergeben, und der Wert „0“ für das Fehlen von sympathischen Nervenendigungen im entsprechenden Portalfeld.

In der Übersichtsbetrachtung zeigte sich, dass bei der Maus sich sympathische Nervenfasern ausschließlich im Bereich der größeren Gefäße, d. h. in der Wand von Pfortaderästen und Ästen der Arteria hepatica, sowie im umliegenden perivaskulären Bindegewebe und interlobulär im Bereich der Periportalfelder nachweisen lassen. Eine Einstrahlung ins intralobuläre Parenchym bzw. in die Sinusoide konnte bei keiner der vier Gruppen gesehen werden. Somit konnte im vorliegenden Modell das bekannte und oben beschriebene

Verteilungsmuster intrahepatischer Innervation bei der Maus bestätigt werden (McCuskey 2004).

Nach der Beurteilung nach dem beschriebenen Scoring-Systems zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

a) Nachweis der erfolgreichen intrahepatischen Sympathektomie

Im Vergleich von Kontroll-Tieren zu sympathektomierten Tieren konnte festgestellt werden, dass sich durch die Sympathektomie neben der Verringerung der sympathischen Nervenfasern im Dünndarm auch deren intrahepatische Dichte signifikant herabgesetzt hat (Score-Mittelwert Kon: $0,95 \pm 0,06$ vs. Sx: $0,78 \pm 0,04$; $p < 0,01$). Es kann somit also davon ausgegangen werden, dass die Sympathektomie nicht nur im Dünndarm erfolgreich war, sondern auch „vor Ort“ im Organ des Interesses des vorliegenden Experiment, also der Leber.

b) Vermehrung intrahepatischer sympathischer Nervenfasern im Rahmen der NASH

Desweiteren konnte durch die Paigen-Fütterung eine Vermehrung von intrahepatischen TH-positiven Nervenfasern erzielt werden. So zeigte das Lebergewebe von Kontrolltieren einen signifikant niedrigeren Score-Wert als das der Tiere mit Paigen-Fütterung (Kon: $0,95 \pm 0,06$ vs. Paigen: $1,47 \pm 0,18$; $p < 0,01$). Dieses Ergebnis deutet also darauf hin, dass es während der NASH intrahepatisch zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems, bzw. zumindest zu einer gesteigerten Aktivität sympathischer, Tyrosin-Hydroxylase-exprimierender Neurone kommt.

c) Stark ausgeprägter Effekt der Sympathektomie im Rahmen der NASH

Stellt man die Score-Werte der Tiere mit Paigen-Fütterung und derer mit zusätzlicher Sympathektomie gegenüber, wird klar, dass die Sympathektomie unter Paigen-Fütterung einen sehr stark ausgeprägten Effekt hat. So sank der mittlere Score-Wert von $1,47 \pm 0,18$ in der Gruppe Paigen auf einen hoch-signifikant niedrigeren Wert von $0,50 \pm 0,09$ ($p < 0,001$). Zudem liegt nach Sympathektomie der Score-Wert in der Gruppe der Tiere mit Paigen-Fütterung auch signifikant unter dem Niveau ihrer Kontroll-Tiere (Paigen + Sx: $0,50 \pm 0,09$ vs. Sx: $0,78 \pm 0,04$, $p < 0,01$), was einen Anhalt dafür gibt, dass es im Laufe einer NASH-

Erkrankung zu einer verstärkten Vulnerabilität des Lebergewebes gegenüber einer Sympathektomie mittels 6-Hydroxy-Dopamin kommt.

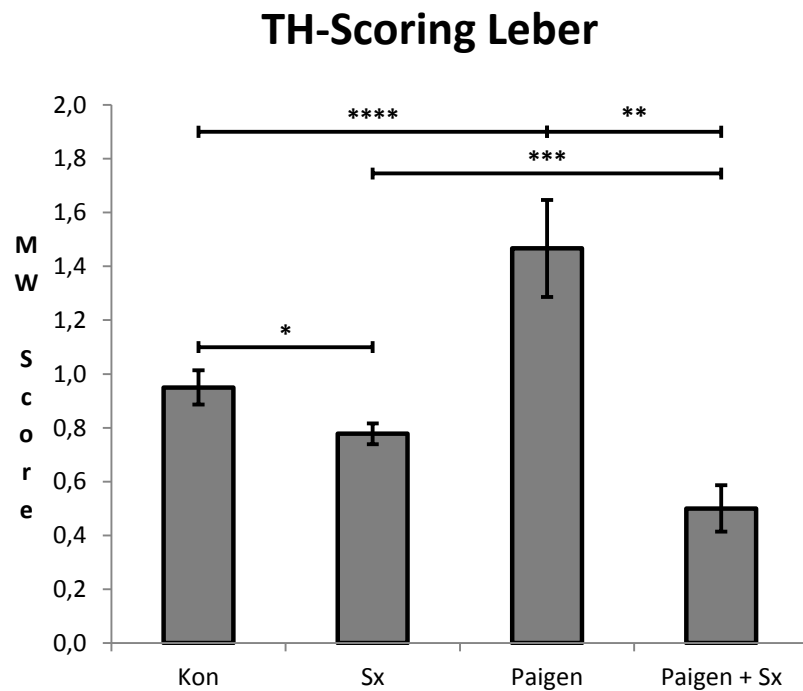


Abbildung 10: TH-Scoring der Leber

Angabe als Mittelwert (MW) der Score-Werte

Signifikante Verringerung des TH-Scores durch Sympathektomie (Kon vs. Sx, * $p < 0,01$), sehr stark ausgeprägter Effekt unter Paigen-Fütterung (Paigen vs Paigen + Sx, ** $p < 0,001$), erhöhte Vulnerabilität gegenüber Sympathektomie während Paigen-Fütterung (Paigen + Sx vs. Sx, *** $p < 0,01$), Vermehrung bzw. stärkere Aktivierung intrahepatischer Nervenfasern in Rahmen der NASH (Kon vs. Paigen, **** $p < 0,01$).

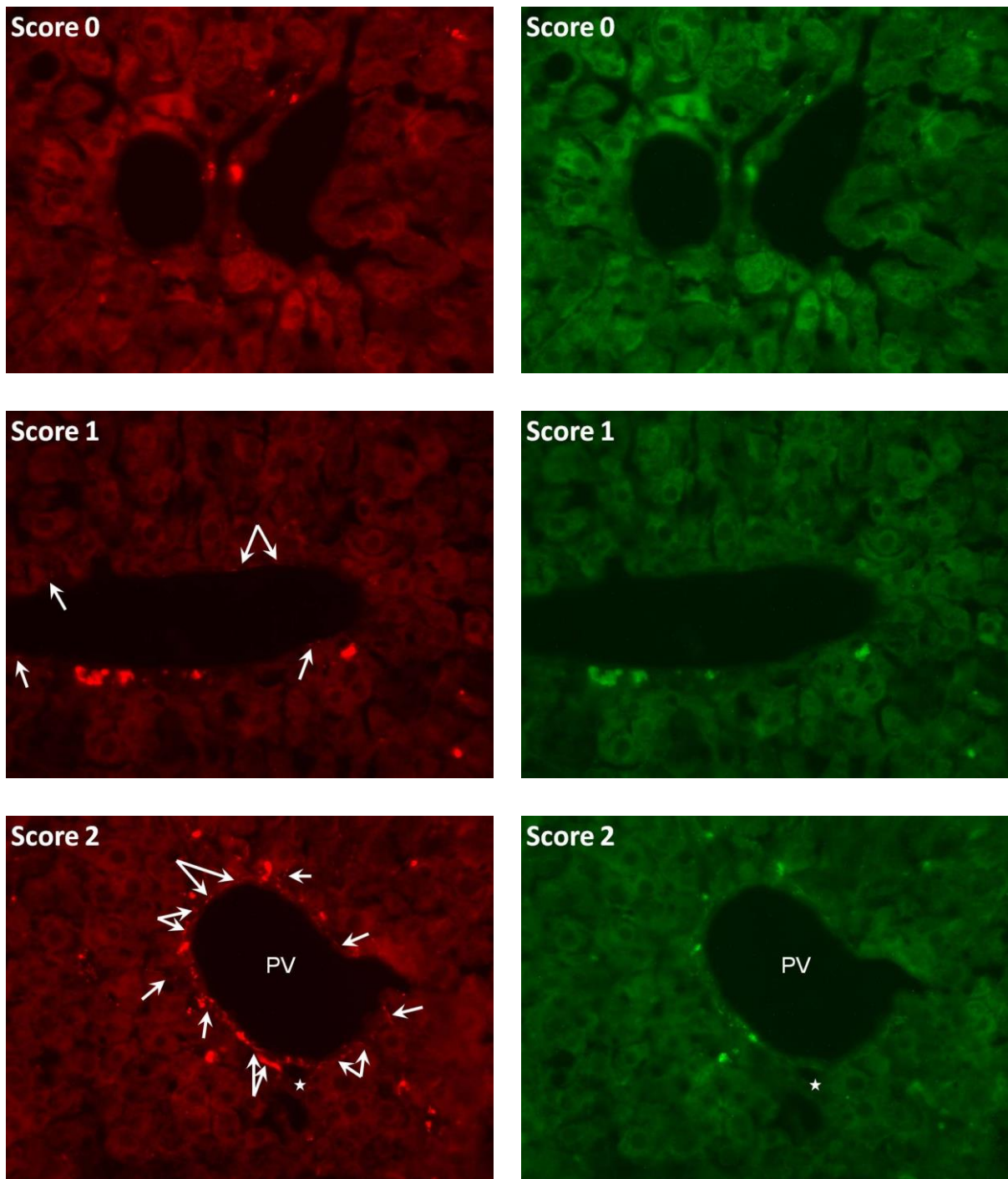


Abbildung 11: TH-Färbung Leber

Repräsentative Beispielbilder für die einzelnen Score-Werte (links), sowie zugehörige Kontrollfärbungen (rechts); Score 0: keine TH-positiven Nervenfasern erkennbar, Score 1: wenige, Score 2: viele; PV: Portalvene; Stern: Ast der Arteria hepatica.

7. Diskussion

7.1 Induktion einer NASH durch Paigen-Fütterung

Im vorliegenden Tiermodell konnte eine 24-wöchige Paigen-Fütterung mit einem Fettgehalt von 35 %, sowie Zusatz von 1,25 % Cholesterol und 0,5 % Cholat wie früher beschrieben erfolgreich eine NASH mit ihren bekannten Komponenten induzieren (Matsuzawa et al. 2007). Makroskopisch fielen ca. zweifach vergrößerte und vom Aspekt her aufgehellte Lebern auf. Analog stellte sich der mikroskopische Befund dar, wobei sich die Paigen-gefütterten Tiere mit einer ausgeprägten Steatose und Ballonierung der Hepatozyten, allerdings mit einer nur eher milden Inflammation und Fibrose präsentierten. Der NAFLD-activity-score (NAS) erreichte einen Zahlenwerte von 6, was die Diagnose NASH zulässt (Kleiner et al. 2005). Anders als andere verfügbare NASH-Modelle kommt das in vorliegender Studie verwendete der natürlichen NASH-Entstehung vermutlich näher. Genetische NASH-Modelle können zwar Adipositas und einen gestörten hepatischen Lipid-Metabolismus imitieren (Larter et al. 2008), ob jedoch eine multifaktoriell verursachte Erkrankung wie die NASH durch die Modifikation eines einzelnen Gens ausreichend abgebildet werden kann, ist fragwürdig. Die weit verbreitete Methionin-Cholin-defiziente (MCD) Diät führt zwar zu einem ausgeprägten und progressiven Leberschaden mit Steatose, lobulärer Inflammation und der typischen perisinusoidalen und pericentralen Fibrose, allerdings fehlt es hier an der Induktion von lipotropen Faktoren und Insulinresistenz (Rinella et Green 2004). Weiterhin vermag die MCD-Diät keine hepatozytäre Ballonierung auszulösen (Ota et al. 2007), ein sehr wichtiges Merkmal, das eine progressive Form der NASH von gutartigen Formen der Fettlebererkrankungen unterscheidet (Matteoni et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer ausgeprägten Ballonierung der Hepatozyten in der Leberbiopsie ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Zirrhose haben sowie stärker gefährdet sind, an einer Leber-bezogenen Erkrankung zu versterben, im Gegensatz zu Patienten mit hepatischer Fettakkumulation und Inflammation alleine (Farrell et Larter 2006). In der vorliegenden Studie konnte diese Ballonierung als aussagekräftiger Marker des hepatozytären Zellschadens sehr ausgeprägt festgestellt werden. Ob die Paigen-Fütterung bei unseren Versuchstieren zu einer Insulinresistenz – ein wichtiger pathogenetischer Mechanismus und Risikofaktor der NASH (Marchesini et al. 2003) – führte, wurde nicht untersucht, konnte jedoch früher bereits gezeigt werden (Matsuzawa et al. 2007). Als

Kritikpunkt an unserem Tiermodell muss jedoch angemerkt werden, dass durch Paigen-Fütterung keine Adipositas als weiterer Hauptrisikofaktor der NASH (Chalasani et al. 2012) induziert werden konnte, was so ebenfalls aus Vorversuchen bekannt ist (Dorn 2009).

Bei der Untersuchung, welche Lipide im Rahmen der NASH in den Leberzellen akkumulieren, stellte sich heraus, dass es keine Unterschiede im hepatozytären Gehalt von sowohl freien Fettsäuren, als auch Triglyceriden gab. Jedoch führte die Paigen-Fütterung zu einer starken Anhäufung von Cholesterol in den Leberzellen, womit ebenfalls frühere Studien bestätigt werden konnten (Dorn 2009). Somit kann abgeleitet werden, dass zumindest im von uns verwendeten Mausmodell wohl Cholesterol jenes Lipid ist, das im Rahmen der NASH eine hepatische Inflamationsreaktion und einen Leberzellschaden auslöst, möglicherweise durch die Erzeugung von oxidativem Stress (Matsuzawa et al. 2007). In lipidomischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass auch beim Menschen Cholesterol dasjenige Lipid ist, das anders als freie Fettsäuren und Triglyceride selektiv in NASH-Lebern im Gegensatz zu Nicht-NASH-Lebern akkumuliert und bedingt durch seine Lipotoxizität zu einem Progress hin zu kritischeren Verläufen der Fettlebererkrankung führt (Farrell et al. 2012, Caballero et al. 2009, Puri et al. 2007). Ein weiterer zugrundeliegender Mechanismus der durch Cholesterol vermittelten Lipotoxizität könnte eine Akkumulation von freiem Cholesterol in Mitochondrien sein, was Hepatozyten für den mitochondrialen Zelltod-Signalweg sensibilisiert. Dies konnte ebenfalls aus Mausexperimenten mit Zugabe von 2 % Cholesterol zur Nahrung abgeleitet werden (Mari et al. 2006). Die Quelle des hepatozytären Chosterols ist in der vorliegenden Studie hauptsächlich die Aufnahme aus der Nahrung. Ein Anteil von 1,25 % Cholesterol an der Nahrung auf den Menschen übertragen würde eine tägliche Zufuhr von mehr als 1200 mg Cholesterol pro Tag bedeuten, wobei die durchschnittliche Aufnahme von Cholesterol aus der Nahrung bei ca. 300 mg pro Tag liegt, also mehr als 4-fach weniger als im vorliegenden Experiment (Ginsberg 2006). Durch den unnatürlich erhöhten Cholesterol-Gehalt an der Nahrung konnte also in vorliegender Studie zwar eine NASH erfolgreich induziert und das für die NASH charakteristische hepatische Lipidmuster imitiert werden. Die Ursachen hepatischer Lipidakkumulation bei der menschlichen NASH sind jedoch sehr wahrscheinlich abgesehen von der Aufnahme einer großen Cholesterol-Menge mit der Nahrung auch noch andere, wie im Abschnitt „Hintergrund“ umfangreich beschrieben. Dies ist als weiterer Kritikpunkt am vorliegend Experiment zu respektieren.

Histologisch konnten als weitere wichtige Komponenten der NASH in den Paigen-Lebern hepatische Inflammation und Fibrosierung beobachtet werden. Neben dem histomorphologischen Nachweis von einzelnen intralobulären Entzündungszellen bei den Paigen-gefütterten Tieren weist eine verstärkte Expression des pro-inflammatorischen TNF im Lebergewebe auf eine hepatische Entzündungsreaktion hin. Aus verschiedenen Tierexperimenten konnte abgeleitet werden, dass eine Hochregulation von TNF maßgeblich an der Einleitung und Aufrechterhaltung einer Inflamationsreaktion im Rahmen der Fettlebererkrankung beteiligt ist (Tomita et al. 2006, Hui et al. 2004). Tatsächlich konnten sowohl bei der alkoholischen, als auch der nicht-alkoholischen Steatohepatitis erhöhte Serumwerte für TNF α nachgewiesen werden (Lalor et al. 2007) und die Serum Werte, sowie die hepatische Expression von TNF korrelierten mit der Schwere der Leberschädigung und der Steatohepatitis bei der NASH (Manco et al. 2007). Die hepatische TNF-Expression war bei Patienten mit NASH signifikant höher als bei denen mit einer einfachen Steatose ohne Inflammation (Crespo et al. 2001). Schließlich gibt es aus sowohl tierexperimentellen als auch menschlichen NASH-Studien Hinweise darauf, dass eine Inhibition des TNF-Signalwegs eine effektive NASH-Therapie sein könnte. Eine Anti-TNF α -Behandlung mittels Pentoxifyllin resultierte in einer signifikanten Abschwächung der Leberschädigung bei Steatohepatitis (Koppe et al. 2004, Satapathy et al. 2004, Adams et al. 2004).

Histologisch zeigte sich desweiteren eine diffuse perizelluläre sinusoidale Faservermehrung, entsprechend einem Fibrosegrad von 1, wobei die Faservermehrung das für die NASH typische Maschendraht- bzw. „chicken-wire“-Muster annahm (Tannapfel et al. 2010, Larter et al. 2008). Die Ausprägung der Fibrose war im vorliegenden Experiment somit eher mild. Entgegen anderer Studien konnte nach 24 Wochen Paigen-Fütterung kein Fortschreiten zu höhergradigeren Fibrosierungszuständen nachvollzogen werden (Matsuzawa et al. 2007). Um den histologischen Befund zu untermauern, wurde die Expression von Collagen-1 im Lebergewebe untersucht. Während eines chronischen Leberzellschadens werden hepatische Sternzellen, die wichtigsten fibrogenen Zellen in der Leber, aktiviert. Diese vollziehen daraufhin eine Verwandlung von einer ruhenden Zelle zu einem Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp, werden proliferativ und exprimieren α -SMA und andere fibrogene Matrixproteine, die während der Leberzirrhose akkumulieren (Friedmann 2000). So ist die Expression der Collagene I, II und IV erhöht, wobei Collagen I das prädominierende Molekül darstellt (Burt et al. 1990, Hahn et al. 1980, Rojkind et al. 1979). In der Tat konnten wir nach

Paigen-Fütterung eine signifikant erhöhte Expression von Collagen-1 nachweisen, zusätzlich zur histologischen Faservermehrung also ein weiterer Hinweis für eine hepatische Fibrosierungsreaktion als Zeichen der NASH.

Als weiterer Marker für die Leberzellschädigung und damit für das erfolgreiche Auslösen einer NASH im vorliegenden Experiment war wie früher beschrieben (Dorn 2009, Matsuzawa et al. 2007) nach Paigen-Fütterung die Transaminase ALT erhöht, die AST-Werte waren nicht signifikant verändert. Dies führte zu einer erniedrigten AST/ALT-ratio. Auch bei der menschlichen NASH sind charakteristischerweise v. a. die ALT-Werte erhöht, sodass die Serum AST/ALT-ratio typischerweise erniedrigt ist, anders als bei der alkoholischen Fettlebererkrankung, bei der dieses Verhältnis eher erhöht ist (Powell 1990, Diehl 1988). Erhöhte Transaminasen sind jedoch nicht zwingend für die Diagnose NASH notwendig. Außer bei sehr fortgeschrittenen Krankheitsverläufen sind die Leber-Blut-Tests oft auch normal oder zeigen typischerweise nur eine milde Erhöhung der Transaminasen um das 1,5- bis 3-Fache und die AST/ALT-ratio ist oft erniedrigt (Day 2012). Nicht-invasive Methoden wie die Transaminasen-Werte und bildgebende Verfahren wie Ultraschall, CT und MR können nicht zuverlässig zwischen einfacher Steatose und Steatohepatitis mit Inflammation und Fibrose unterscheiden, weshalb noch immer das Dogma besteht, dass eine Leber-Biopsie bzw. – Histologie weiterhin das zuverlässigste Instrument zur Identifikation der Anwesenheit einer Steatohepatitis und Fibrose bei Patienten mit einer Fettlebererkrankung darstellt (Chalasani et al. 2012). Erhöhte Transaminasen sind also zur Diagnose der NASH nicht notwendig, können aber als weiterer Nachweis dienen, dass die verwendete Paigen-Diät zu einer Leberschädigung geführt hat.

Insgesamt konnte also durch Paigen-Fütterung als erste Basis unseres Tierversuchs erfolgreich eine NASH imitiert werden, was sowohl histologisch, als auch durch weiterführende unterstützende Untersuchungen bewiesen werden konnte.

7.2 Erfolgreiche Inhibition des SNS durch Sympathektomie mittels 6-OH-DA und verstärkter Effekt während NASH

Durch die Anfärbung Tyrosin-Hydroxylase enthaltender sympathischer Neurone konnte die Effektivität des Sympathotoxins 6-Hydroxy-Dopamin (6-OH-DA) nachgewiesen werden. 6-OH-DA war die erste chemische Substanz, von der man wusste, dass sie in vielen Spezies wie dem Meerschweinchen, der Ratte, der Maus und der Katze eine selektive Zerstörung

sympathischer Nervenzellen bewirkt und so eine lang anhaltende Depletion von Catecholaminen im Gewebe verursacht (Picklo 1997). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass 6-OH-DA zu einer Zerstörung sympathischer Nervenendigungen führt (Thoenen et Tranzer 1968). Dabei quillt die sympathische Nervenfasern vor der Synapse auf, was in deren Untergang endet (Malmfors et Sachs 1968).

In unserem Experiment verursachte die intraperitoneale Verabreichung von 6-OH-DA einen ca. 80-prozentigen Verlust noradrenerger Nervenfasern im Dünndarmgewebe, sowie eine signifikante Verringerung der sympathischen Innervation in der Leber, die jedoch durch unsere fluoreszenzimmunhistochemische Methode nicht in Prozent ausdrückbar ist. In früheren Versuchen an Ratten konnte jedoch nachgewiesen werden, dass eine intraperitoneale Gabe von 6-OH-DA in einem Abfall des intrahepatischen Noradrenalin-Gehalts von 87 bzw. 82 Prozent resultierte (Dubuisson et al. 2002, Piñon et al. 1999). Ähnliche Ergebnisse konnten durch mikrochirurgische hepatische Denervation (Lindfeldt et al. 1987), die intraportale Gabe von 6-OH-DA (Wheatley et al. 1993) und durch hepatische Denervation mittels Phenol (Carreno et Seelaender 2004) erzielt werden. Desweiteren ist bekannt, dass der hepatische Noradrenalin-Gehalt mit dem Grad der hepatischen Innervation korreliert (Wheatley et al. 1993). Auch wenn 6-OH-DA nicht zu einem kompletten Verlust noradrenerger Fasern bis unterhalb der Nachweisgrenze führt, so gilt dennoch allgemein eine ca. 80-prozentige Verminderung des Noradrenalin-Gehalts eines Organs als ausreichend, in einer Studie zum Einfluss der sympathischen Innervation auf ein Organ eine adäquate Inhibition dieser Neurone in demselben sicherzustellen (Carreno et Seelaender 2004, Lindfeldt et al. 1987, Homin et al. 1984).

Einen besonders stark ausgeprägten Effekt konnte 6-OH-DA auf die hepatische Innervation unter Paigen-Fütterung, also im Rahmen der erzeugten NASH, ausüben. Während der NASH konnte im vorliegenden Modell eine Vermehrung bzw. Aktivierung intrahepatischer sympathischer Nervenfasern beobachtet werden. Nach der Sympathektomie mittels 6-OH-DA war die Dichte der TH-positiven Nervenfasern jedoch noch einmal signifikant niedriger als bei den sympathektomierten Tieren der Kontrollgruppe, also Tieren ohne NASH. Ein Grund dafür ist wohl in der Wirkungsweise von 6-OH-DA zu suchen. Die Toxizität von 6-OH-DA beruht auf zwei Schritten: der erste Schritt bestimmt die Selektivität auf noradrenerge Fasern, da 6-OH-DA durch die spezifische Noradrenalin-reuptake-Pumpe in die Nervenfasern

aufgenommen wird, wo das Sympathotoxin anschließend eine Reihe von chemischen Transformationen zu reaktiven Verbindungen erfährt. Dies führt zur Produktion von Wasserstoffperoxid, Superoxid-Anionen und Wasserstoff-Radikalen, die schließlich die Integrität der Nervenfasern-Membran schädigen (Picklo 1997). Im vorliegenden Experiment konnte nun gezeigt werden, dass Paigen-Fütterung zu einer verstärkten Aktivität intrahepatischer Nervenfasern führt. Dies resultiert vermutlich in einer gleichzeitig gesteigerten Aktivität des Noradrenalin-reuptakes, wodurch auch eine größere Menge 6-OH-DA in das Neuron eindringen und so die sympathische Faser effektiver zerstören kann. Durch diesen Mechanismus lässt sich vermutlich der ausgeprägte Effekt der Sympathektomie während der NASH erklären.

7.3 Kompensatorisch gesteigerte sympathische Leberinnervation im Rahmen der NASH

Durch die fluoreszenzimmunhistochemische Untersuchung des Lebergewebes konnten wir zeigen, dass sich – wie früher bereits beschrieben (Akiyoshi et al. 1998, Fukuda et al. 1996) – bei der Maus Tyrosin-Hydroxylase exprimierende sympathische Nervenfasern exklusiv im Bereich der Periportalfelder nachweisen lassen. Intralobulär ließen sich keine Fasern feststellen. Diese topographische Verteilung war bei den Kontrolltieren sowie den Paigen-gefütterten NASH-Tieren gleich. In der Dichte der sympathischen Innervation gab es jedoch – wie im letzten Abschnitt bereits kurz angeschnitten – signifikante Unterschiede: während der NASH entwickelten die Versuchstiere eine aktivierte bzw. vermehrte sympathische intrahepatische Versorgung.

Das Nervengewebe wird üblicherweise als relativ statisches Gewebe angesehen. Aufgrund verschiedener Beobachtungen kann jedoch abgeleitet werden, dass die hepatische Innervation eine gewisse Plastizität aufweist, worauf sich auch die beobachtete größere Dichte intrahepatischer Nervenfasern im Rahmen der NASH im vorliegenden Experiment begründen könnte. So gibt es sowohl tierexperimentell als auch aus klinischen Studien begründete Hinweise dafür, dass es nach einer orthotopen Lebertransplantation bzw. einer chirurgischen Leberdenervation zu einer gewissen hepatischen Reinnervation kommt (Sakamoto et al. 2000, Dhillon et al. 1992, Ito et al. 1998). Während es für die NASH vor unserer Studie unseres besten Wissens noch nicht untersucht wurde, konnten desweiteren Jaskiewicz et al. eine gesteigerte Anzahl hepatischer Nervenfasern in der Umgebung der

Pfortader-Äste im Rahmen der alkoholischen Steatohepatitis ohne Zeichen der portalen Hypertension beobachten (Jaskiewicz et al. 1994). Dagegen fehlten in zirrhotischen Knoten und fibrotischem Lebergewebe auf dem Boden einer alkoholischen Leberzirrhose beim Menschen die ansonsten bei gesunden Lebern vorhandenen parenchymalen Nervenfasern (Fukuda et al. 1996, Jaskiewicz et al. 1994).

Der Grund für die beobachtete Aktivitätssteigerung der intrahepatischen sympathischen Innervation könnte ein Kompensationsversuch auf die Überladung der Leber mit Cholesterol und Lipiden sein. Es ist bekannt, dass Noradrenalin bzw. sympathische hepatische Nerven an der Regulation der hepatischen Lipid-Oxidation, also dem Verbrennen von Lipiden, und des Lipid-Exports mittels VLDL beteiligt sind (Tavares et Seelaender 2008, Carreño et Seelaender 2004, Barke et al. 1993). Dass es sich dabei tatsächlich am ehesten um einen Kompensationsversuch und nicht um eine Ursache für die vermehrte hepatische Cholesterol-Einlagerung handelt, wird dadurch klar, dass nach Sympathektomie die hepatische Cholesterol-Konzentration im Vergleich zur NASH mit intaktem sympathischem Nervensystem noch einmal signifikant gesteigert war. Dieser protektive Mechanismus scheint aber netto dennoch zu gering zu sein, um die Entstehung der Fettleber komplett aufhalten zu können.

Insgesamt gibt unsere Studie also einen Hinweis dafür, dass es im Rahmen der NASH zu einer kompensatorisch gesteigerten Sympathikusaktivität in der Leber kommt, vermutlich um den hepatischen Lipid-Stoffwechsel zu steigern und so der Steatose entgegenzuwirken.

7.4 Verstärkte hepatische Cholesterin-Akkumulation unter SNS-Inhibition

Ein weiteres Ziel unserer Studie war die Untersuchung des Einflusses einer Blockade des sympathischen Nervensystems auf den „first hit“, die Steatosis hepatis. Insgesamt konnte die Sympathektomie den Verlauf der NASH nur gering beeinflussen. Während die Verabreichung von 6-OH-DA keine mikroskopisch fassbaren Unterschiede sowie keine Veränderung der intrahepatischen Konzentration freier Fettsäuren und Triglyceride bewirken konnte, war lediglich das makroskopische Aussehen der Lebern nach Sympathektomie verändert, jedoch sowohl bei den Kontroll-Tieren, als auch bei den NASH-Tieren. Dabei zeigten diese Lebern einen knotigen Aspekt mit abgerundeten Leberrändern, ohne dass dafür jedoch histomorphologische Korrelate – wie z. B. zirrhotische

Regeneratknoten – zu finden waren. Was also hinter diesem veränderten makroskopischen Aussehen steckt, konnte nicht herausgefunden werden, es könnte sich um eine direkte Toxizität des intraperitoneal applizierten 6-OH-DA auf die Leberoberfläche handeln.

Der Haupteffekt der SNS-Inhibition mittels 6-OH-DA war im vorliegenden Experiment sicher die zusätzlich gesteigerte Cholesterol-Akkumulation während Paigen-Fütterung. Wie im vorherigen Abschnitt bereits kurz angeschnitten, kann aus unseren Versuchen abgeleitet werden, dass diese höchstwahrscheinlich durch den Wegfall des kompensatorisch erhöhten intrahepatischen Sympathikotonus während der NASH vermittelt war. Es ist schon länger bekannt, dass der hepatische Lipid-Metabolismus durch das sympathische Nervensystem bzw. die Catecholamine als dessen Effektoren reguliert wird. So gibt es Studien, die dem Sympathikus einen eher fördernden Effekt auf die hepatische Steatose zuschreiben, im Gegensatz dazu gehen andere jedoch eher von einer protektiven Wirkung aus, was im Folgenden diskutiert werden soll. Die Netto-Wirkung des SNS auf den hepatischen Lipid-Status konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden.

Thörne et al. konnten zeigen, dass eine gesteigerte Sympathikusaktivität über eine Stimulation der Lipolyse im viszeralen Fettgewebe für erhöhtes Leberfett verantwortlich sein kann. Die hepatische Fettakkumulation, so konnte diese Gruppe herausfinden, ist mit einer ausgeprägten Steigerung der Noradrenalin-stimulierten Freisetzung freier Fettsäuren aus viszeralen Adipozyten korreliert (Thörne et al. 2010). Dieser Mechanismus scheint jedoch in unserem Tierexperiment nicht beteiligt zu sein, zum einen, da unsere NASH-Tiere keine Adipositas und keine Anzeichen für vermehrtes viszerale Fett zeigten, und zum anderen in unserer Studie Cholesterol das vorherrschende Lipid in den NASH-Lebern darstellt, das aus einer erhöhten Zufuhr aus der Nahrung, und nicht einer gesteigerten Lipolyse aus dem Fettgewebe stammt.

Der Effekt des sympathischen Nervensystems auf den hepatischen Lipidstoffwechsel ist angesichts sich teilweise widersprechender Literatur noch immer kontrovers. Einerseits führt die Verabreichung von Adrenorezeptor(AR)-Agonisten in vivo und die Überexpression von Adrenorezeptoren auf Hepatozyten in vitro zu einer verstärkten Fett-Akkumulation in der Leber, wohingegen diese durch Adrenorezeptor-Antagonisten vermindert werden konnte (Ghosh et al. 2012). Im gleichen Sinn konnten AR-Agonisten an isolierten Ratten-Hepatozyten die Triglycerid-Sekretion durch VLDL inhibieren und so den intrazellulären

Triglycerid-Gehalt steigern (Rasouli et Zahraie 2006), und während isolierter Leberperfusion der Ratte konnten diese eine abgeschwächte Sekretion von Triglyceriden und ApoB, dem Schlüsselprotein der VLDL-Synthese, bewirken (Yamauchi et al. 1998). Umgekehrt resultierte eine sympathische Denervierung der Leber in erhöhten Serum-Triglyceriden und – Cholesterol und einer gesteigerten mittleren Triglycerid-Sekretionsrate aus der Leber, der am ehesten eine aktivierte VLDL-Sekretion zugrunde lag (Rasouli et al. 2012).

Andere sehen in einer Sympathikus-Aktivierung eine eher protektive Wirkung auf die hepatische Steatose, in einer SNS-Inhibition folglich also einen Mechanismus, der die Fetteinlagerung verstärkt. Dies ist die Sichtweise, die auch durch die Ergebnisse unseres Experiments unterstützt wird, zumal wir durch Sympathektomie ein erhöhtes Cholesterol in den Hepatozyten bewirken konnten. Dies kann zum einen einer gestörten Lipid-Oxidation geschuldet sein. Epinephrin-defiziente Mäuse entwickeln unter längerem Fasten eine ausgeprägte Fettleber, was am ehesten auf eine verminderte Oxidation anfallender Lipide zurückzuführen war (Sharara-Chami et al. 2012) und umgekehrt steigerten AR-Agonisten in Zellkulturversuchen die mitochondriale β -Oxidation, vermittelt durch eine gesteigerte Expression der Carnitin-Palmitoyl-Transferase (CPT), die den Geschwindigkeit-bestimmenden Schritt der hepatischen mitochondrialen β -Oxidation katalysiert (Barke et al. 1993). Andererseits verminderte eine sympathische Leber-Denervation die Aktivität von CPT I und II im Lebergewebe, was über einen gesteigerten Einbau langkettiger Fettsäuren in den Lipidspeicher der Hepatozyten zu einem erhöhten absoluten hepatischen Fettgehalt führte, wobei zusätzlich auch die Aufnahme exogener Fettsäuren in hepatisch sekretierte VLDL-Partikel abgeschwächt war (Carreño et Seelaender 2004). In einer weiteren Studie konnte nach Denervation eine verminderte Sekretion von VLDL-TG und eine abgeschwächte Expression von CPT I und ApoB nachgewiesen werden (Tavares et Seelaender 2008).

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass die letztgenannten Studien, sowie die Ergebnisse unseres Tierexperiments die Annahme unterstreichen, dass eine Inhibition der sympathischen Innervation einen Steatose-induzierenden Effekt ausübt, was möglicherweise durch eine kombinierte Störung der Lipid-Oxidation und des Lipid-Export durch VLDL vermittelt wird.

7.5 Unveränderte Inflammation und Fibrose nach Sympathektomie

Obwohl das sympathische Nervensystems mit einer immunomodulatorischen Wirkung in Verbindung gebracht wird (Seematter et al. 2004) und so auch als möglicher Einflussfaktor auf verschiedene Lebererkrankungen gilt (Vere et al. 2009, Chida et al. 2006, Swain 2000), konnte in unserem Versuch die Behandlung mit 6-OH-DA zur Inhibierung des sympathischen Nervensystems die hepatische Inflammation im Rahmen der NASH nicht beeinflussen. So waren die Tiere mit und ohne Sympathektomie weder histomorphologisch in ihrem Inflammationsgrad, noch in Bezug auf ihren Expressionsgrad von TNF im Lebergewebe als Marker der hepatischen Entzündungsreaktion zu unterscheiden. Als einziger, jedoch schwacher Hinweis, dass eine Inhibierung des sympathischen Nervensystems zu einer Abschwächung der hepatischen Schädigung führt, ist eine leichte, jedoch signifikante Erniedrigung der Serum-ALT durch Sympathektomie während der NASH zu werten. Da die Transaminasen für die Diagnostik der NASH jedoch wenig sensitiv und spezifisch sind (Day 2012), kann aus einer isolierten Verbesserung der ALT, ohne analoge histologische und molekularbiologische Befunde, nicht auf einen signifikanten Effekt einer Sympathikus-Inhibierung auf den NASH-Verlauf geschlossen werden.

In puncto der fibrogenen Prozesse während Paigen-Fütterung konnte durch Sympathektomie ebenfalls kein Effekt nachgewiesen werden. Histologisch zeigten die NASH-Tiere – egal ob mit oder ohne 6-OH-DA-Behandlung – eine nicht zu unterscheidende Ausprägung der hepatischen Faservermehrung, und passend dazu war auch die hepatische Expression von Collagen-1 nicht verändert.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu verschiedenen Untersuchungen zur Rolle sympathischer Neurotransmitter hinsichtlich der Leber-Fibrogenese (Oben et Diehl 2004). Hepatische Sternzellen, die Hauptproduzenten extrazellulärer Matrix als Reaktion auf Schädigungen der Leber verschiedenster Art (Friedmann 2000), stehen in enger räumlicher Beziehung zu sympathischen Nervenendigungen (Bioulac-Sage et al. 1990). Sie exprimieren sowohl Adrenorezeptoren und deren abhängige intrazelluläre Signalmoleküle als auch die Schlüsselenzyme der Catecholamin-Synthese Tyrosin-Hydroxylase und Dopamin- β -Hydroxylase (Oben et al. 2004, Yang et al. 2008). Noradrenalin stimuliert das Wachstum von HSC in Zellkultur und umgekehrt hemmen Adrenorezeptor-Antagonisten ihre Proliferation (Oben et al. 2004, Yang et al. 2008, Liu et al. 2007). Ebenso kann der sympathische

Cotransmitter Neuropeptid Y die Proliferation von HSC stimulieren, was mit einer erhöhten Expression des pro-fibrogenen Zytokins TGF β und Collagen-1 assoziiert ist (Oben et al. 2003). Gleichmaßen stimuliert Noradrenalin selbst die Expression dieser Signalstoffe (Yang et al. 2008, Oben et al. 2003). Neben einer pro-fibrogenen Wirkung in Zellkulturversuchen konnte Noradrenalin auch in vivo in Leptin-defizienten ob/ob-Mäusen, die normalerweise vor einer hepatischen Fibrose geschützt sind (Honda et al. 2002), eine hepatische Fibrogenese induzieren (Oben et al. 2003) und sowohl ein noradrenerger Antagonismus, als auch die pharmakologische Destruktion von noradrenergen Fasern inhibierte die Entwicklung der Leber-Fibrose im Rahmen eines CCl₄-induzierten Leberschadens bei Ratten (Dubuisson et al. 2002). Analog entwickelten spontan hypertensive Ratten, die ohne Behandlung ein überaktives sympathisches Nervensystem besitzen (Hsu 1992), eine stärker ausgeprägte Leberfibrose auf CCl₄-Intoxikation als Kontroll-Ratten (Hsu et al. 1995) und die Sympathektomie mittels 6-OH-DA führte zu einer Abschwächung des Leberschadens (Hsu et al. 1993). Schließlich gibt es auch Hinweise dafür, dass die Regenerationskapazität der Leber durch das SNS reguliert wird, zumal Sympathektomie bzw. α -Adrenorezeptor-Antagonisten die Anzahl hepatischer Stammzellen anheben und so die Leber-Regeneration als Antwort auf eine Leberschädigung durch eine Antioxidantien-depletierte Diät verbessern konnten (Oben et al. 2003).

Die Ergebnisse aus unserem Tierexperiment können die im Vorherigen beschriebenen Studien zum pro-fibrogenen Einfluss des sympathischen Nervensystems nicht bestätigen. Viele der beschriebenen Erkenntnisse gehen aus Zellkulturversuchen (Yang et al. 2008, Liu et al. 2007, Oben et al. 2004, Oben et al. 2003) bzw. aus Tierversuchen mit chemisch induziertem Leberschaden (Dubuisson et al. 2002, Hsu et al. 1995) oder Antioxidantien-defizienter Diät (Oben et al. 2003) hervor, von denen bekannt ist, dass sie einen ausgeprägteren Leberschaden induzieren als in unserem Experiment, in dem wir nur eine milde Inflammation und Fibrose feststellen konnten. So war die Leberschädigung im vorliegenden Versuch also vermutlich nicht stark genug, als dass die Sympathektomie ihren Effekt hätte ausüben können. Jedoch bildet unser rein diätetisches Tiermodell die Pathogenese der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis vermutlich besser ab als Versuche an isolierten Zellen oder Studien mit chemisch induziertem Leberschaden. Als Gegenstand weiterer Forschung könnte somit dienen, ein rein diätetisches Tiermodell zu erschaffen, bzw. das vorliegende dahingehend zu modifizieren, dass es in der Lage ist, eine noch stärkere

Leberschädigung auszulösen. Desweiteren sollte versucht werden, das sympathische Nervensystem noch Leber-spezifischer zu blockieren, um dessen Effekt besser auf die Leber eingrenzen zu können.

8. Zusammenfassung

Bis dato steht bis auf die Behandlung der unter dem Metabolischen Syndrom zusammengefassten Hauptrisikofaktoren der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen kein definitiver medikamentöser Behandlungsansatz dieses Erkrankungsspektrums zur Verfügung. Darüber hinaus ist noch gänzlich ungeklärt, welche Faktoren einen Übergang zu aggressiveren Krankheitsverläufen bedingen. Da es im Rahmen des Metabolischen Syndroms zu einer Überaktivität des Sympathischen Nervensystems kommt und bekannt ist, dass der Sympathikus sowohl an der Regulation des Metabolismus des Gesamtorganismus, als auch der Leber im Speziellen und hepatischer Inflammations- und Fibrosierungsvorgänge beteiligt ist, sollte in der vorliegenden Studie der Einfluss einer Inhibition des sympathischen Nervensystems auf die einzelnen Komponenten der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis anhand eines rein diätetischen Mausmodells untersucht werden.

Dazu wurden Mäuse 24 Wochen lang mit der Paigen-Diät gefüttert. Diese zeichnet sich durch einen Fettanteil von 35 % und einen Zusatz von 1,25 % Cholesterol und 0,5 % Cholat aus. Eine Inhibition des Sympathikus erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 6-Hydroxy-Dopamin (6-OH-DA) zur chemischen Sympathektomie.

Die Paigen-Fütterung konnte nach 24 Wochen das Vollbild einer NASH mit ihren wesentlichen histologischen Komponenten induzieren. Die erfolgreiche Sympathektomie wurde anhand fluoreszenzimmunhistochemischer Färbungen Tyrosin-Hydroxylase exprimierender sympathischer Nervenfasern im Dünndarm- und Lebergewebe nachgewiesen. Im Rahmen der NASH stellte Cholesterol das vorrangig in der Leber akkumulierende Lipid dar. Wohl als kompensatorische Reaktion auf die Überladung der Leber mit Cholesterol konnte während der NASH eine Aktivitätssteigerung der hepatischen sympathischen Innervation beobachtet werden. Die Cholesterol-Einlagerung konnte durch Sympathektomie zusätzlich gesteigert werden. Die Verabreichung von 6-OH-DA hatte jedoch keinen Einfluss auf die hepatische Inflammation und Fibrose, was histologisch und durch die Bestimmung von TNF und Collagen-1 gezeigt werden konnte.

Insgesamt kann aus unserem rein diätetischen NASH-Mausmodell abgeleitet werden, dass das Sympathische Nervensystem zwar den hepatischen Lipidstoffwechsel mitreguliert, jedoch keinen Einfluss auf hepatische Inflammation und Fibrose hat.

9. Literaturquellen

Abiru S, Migita K, Maeda Y, et al. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2006;26:39–45

Adams LA, Zein CO, Angulo P, Lindor KD. A pilot trial of pentoxifylline in nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:2365–2368

Ahima R.S., Saper C.B., Flier J.S., Elmquist J.K. (2000) Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.* 21, 263–307.

Ahmed U, Redgrave TG, Oates PS. Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Aug;24(8):1463-71.

Ajakaiye MA, Jacob A, Wu R, Zhou M, Ji Y, Dong W, Wang Z, Qiang X, Chaung WW, Nicastro J, Coppa GF, Wang P. Upregulation of Kupffer cell α 2A-Adrenoceptors and downregulation of MKP-1 mediate hepatic injury in chronic alcohol exposure. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jun 10;409(3):406-11. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.007. Epub 2011 May 7.

Akiyoshi H, Gonda T, Terada T. A comparative histochemical and immunohistochemical study of aminergic, cholinergic and peptidergic innervation in rat, hamster, guinea pig, dog and human livers. *Liver.* 1998 Oct;18(5):352-9.

André C, Couton D, Gaston J, Erraji L, Renia L, Varlet P, Briand P, Guillet JG. beta2-adrenergic receptor-selective agonist clenbuterol prevents Fas-induced liver apoptosis and death in mice. *Am J Physiol.* 1999 Mar;276(3 Pt 1):G647-54.

Angelico F, Del Ben M, Conti R, Francioso S, Feole K, Fiorello S, Cavallo MG, Zalunardo B, Lirussi F, Alessandri C, Violi F. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Mar;90(3):1578-82. Epub 2004 Dec 14.

Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol.* 2006 Feb;87(1):1-16. Review.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K,

Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 79–83.

Arner P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005 Dec;19(4):471-82.

Asano, T., Watanabe, K., Kubota, N., Gunji, T., Omata, M., Kadowaki, T., and Ohnishi, S. (2009). Adiponectin knockout mice on high fat diet develop fibrosing steatohepatitis. *J. Gastroenterol.Hepatol.* 24, 1669–1676.

Barke RA, Brady PS, Brady LJ. The regulation of mitochondrial fatty acid oxidation and hepatic gene expression by catecholamine. *J Surg Res.* 1993 Feb;54(2):95-101.

Bian Z, Ma X. Liver fibrogenesis in non-alcoholic steatohepatitis. *Front Physiol.* 2012;3:248. doi: 10.3389/fphys.2012.00248. Epub 2012 Jul 11.

Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, Rohleder N, Humpert PM, Petrov D, Ferstl R, von Eynatten M, Wendt T, Rudofsky G, Joswig M, Morcos M, Schwaninger M, McEwen B, Kirschbaum C, Nawroth PP. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb 18;100(4):1920-5. Epub 2003 Feb 10.

Bioulac-Sage P, Lafon ME, Saric J, Balabaud C. Nerves and perisinusoidal cells in human liver. *J Hepatol* 1990;10:105-112.

Bray GA, York DA, Fisler JS. Experimental obesity: a homeostatic failure due to defective

Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2002 Jul;123(1):134-40.

Burt, A.D., Griffiths, M.R., Schuppan, D., Voss, B. and MacSween, R.N. (1990) Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins in liver biopsies using ultracryomicrotomy and immuno-gold labelling. *Histopathology* 16, 53-58.

Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond).* 2009 Apr;116(7):539-64. Review.

Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, Fernández-Checa JC, Caballería J, García-Ruiz C. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol.* 2009 Apr;50(4):789-96. doi: 10.1016/j.jhep.2008.12.016. Epub 2009 Jan 14.

Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology.* 1999 Mar;29(3):664-9.

Carreño FR, Seelaender MC. Liver denervation affects hepatocyte mitochondrial fatty acid transport capacity. *Cell Biochem Funct.* 2004 Jan-Feb;22(1):9-17.

Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ; American Gastroenterological Association; American Association for the Study of Liver Diseases; American College of Gastroenterology. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology.* 2012 Jun;142(7):1592-609. doi: 10.1053/j.gastro.2012.04.001. Epub 2012 May 15. No abstract available. Erratum in: *Gastroenterology.* 2012 Aug;143(2):503.

Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2002 Apr;35(4):898-904.

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, et al: Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996; 84: 491–495.

Cheung O, Sanyal AJ. Abnormalities of lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2008 Nov;28(4):351-9. Epub 2008 Oct 27. Review.

Chida Y, Nobuyuki Sudo Chiharu Kubo. Psychological stress impairs hepatic blood flow via central CRF receptor in mice. *Life Sci.* 2005; 76: 1707–12.

Chida Y, Sudo N, Kubo C. Does stress exacerbate liver diseases? *J Gastroenterol Hepatol.* 2006 Jan;21(1 Pt 2):202-8.

Chida Y, Sudo N, Takaki A, Kubo C. The hepatic sympathetic nerve plays a critical role in preventing Fas induced liver injury in mice. *Gut*. 2005 Jul;54(7):994-1002.

Cortez-Pinto H, Jesus L, Barros H, Lopes C, Moura MC, Camilo ME. How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? *Clin Nutr*. 2006 Oct;25(5):816-23. Epub 2006 May 4.

Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001;34:1158–1163

Cypess AM, Kahn CR. The role and importance of brown adipose tissue in energy homeostasis. *Curr Opin Pediatr*. 2010 Aug;22(4):478-84. doi: 10.1097/MOP.0b013e32833a8d6e.

Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009 Apr 9;360(15):1509-17. doi: 10.1056/NEJMoa0810780.

Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998 Apr;114(4):842-5.

Day CP. Clinical spectrum and therapy of non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis*. 2012;30 Suppl 1:69-73. doi: 10.1159/000341128. Epub 2012 Oct 11.

Day CP. From fat to inflammation. *Gastroenterology*. 2006 Jan;130(1):207-10.

Deng QG, She H, Cheng JH, et al: Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. *Hepatology* 2005; 42: 905–914.

Dhillon AP, Sankey EA, Wang JH, Wightman AK, Mathur S, Burroughs AK, Scheuer PJ. Immunohistochemical studies on the innervation of human transplanted liver. *J Pathol*. 1992 Jun;167(2):211-6.

Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohollike liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology*. 1988 Oct;95(4):1056-62.

Diehl AM, Li ZP, Lin HZ, Yang SQ. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005;54: 303–306

Ding WG, Fujimura M, Mori A, Tooyama I, Kimura H. Light and electron microscopy of neuropeptide Y-containing nerves in human liver, gallbladder, and pancreas. *Gastroenterology*. 1991 Oct;101(4):1054-9.

Diraison F, Moulin P, Beylot M. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab*. 2003 Nov;29(5):478-85.

Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005 May;115(5):1343-51.

Dorn, Christoph; Analysis of the effects of xanthohumol on hepatic homeostasis, inflammation, fibrosis and cancerogenesis; Dissertation; Universität Regensburg, 2009

Dubuisson L, Desmoulière A, Decourt B, Evadé L, Bedin C, Boussarie L, Barrier L, Vidaud M, Rosenbaum J. Inhibition of rat liver fibrogenesis through noradrenergic antagonism. *Hepatology*. 2002 Feb;35(2):325-31.

Eck, M.J., Sprang, S.R. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J.Biol.Chem*. v264 pp.17595-17605 , 1989.

Fan CY, Pan J, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase: implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem* 1998;273(25):15639–15645

Fan JG, Qiao L. Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2009 Jun;8(3):233-40. Review.

Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: S99–112.

Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver*. 2012 Apr;6(2):149-71. doi: 10.5009/gnl.2012.6.2.149. Epub 2012 Apr 17.

Fehér E, Fodor M, Görcs T, Fehér J, Vallent K. Immunohistochemical distribution of neuropeptide Y and catecholamine-synthesizing enzymes in nerve fibers of the human liver. *Digestion*. 1991;50(3-4):194-201.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957 ;226(1):497-509.

Fox-Robichaud A, Kubes P. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha-stimulated leukocyte recruitment into the murine hepatic circulation. *Hepatology* 2000;31:1123–1127

Friedman JM: Obesity: Causes and control of excess body fat. *Nature* 2009; 459: 340–342.

Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*. 2000 Jan 28;275(4):2247-50.

Fukuda Y, Imoto M, Koyama Y, Miyazawa Y, Hayakawa T. Demonstration of noradrenaline-immunoreactive nerve fibres in the liver. *J Int Med Res*. 1996 Nov-Dec;24(6):466-72.

Fukudo S, Suzuki J, Tanaka Y, Iwahashi S, Nomura T. Impact of stress on alcoholic liver injury; a histopathological study. *J Psychosom Res*. 1989;33(4):515-21.

George J, Farrell GC. Practical approach to the diagnosis and management of people with fatty liver diseases. In: Farrell GC, Hall P, George J, McCullough AJ (eds). *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Blackwell: Malden, MA, 2005, pp. 181–193. 5. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G

Ghosh PM, Shu ZJ, Zhu B, Lu Z, Ikeno Y, Barnes JL, Yeh CK, Zhang BX, Katz MS, Kamat A. Role of β -adrenergic receptors in regulation of hepatic fat accumulation during aging. *J Endocrinol*. 2012 Jun;213(3):251-61. doi: 10.1530/JOE-11-0406. Epub 2012 Mar 28.

Ginsberg HN. Is the slippery slope from steatosis to steatohepatitis paved with triglyceride or cholesterol? *Cell Metab*. 2006 Sep;4(3):179-81.

Goehler LE, Sternini C. Neuropeptide Y immunoreactivity in the mammalian liver: pattern of innervation and coexistence with tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *Cell Tissue Res.* 1991 Aug;265(2):287-95.

Grassi G, Dell'Oro R, Facchini A, Quarti Trevano F, Bolla GB, Mancina G. Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *J Hypertens.* 2004 Dec;22(12):2363-9.

Guimaraes, E.L., Franceschi, M.F., Grivicich, I., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C., Guaragna, R.M., Borojevic, R., Margis, R., and Guma, F.C. (2006). Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cellline. *Liver Int.* 26, 477–485.

Hahn, E., Wick, G., Pencev, D. and Timpl, R. (1980) Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin. *Gut* 21, 63-71.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al: Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269: 543–546.

Härle P, Möbius D, Carr DJ, Schölmerich J, Straub RH. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52(4):1305-13.

Henkel J, Frede K, Schanze N, Vogel H, Schürmann A, Spruss A, Bergheim I, Püschel GP. Stimulation of fat accumulation in hepatocytes by PGE₂-dependent repression of hepatic lipolysis, β -oxidation and VLDL-synthesis. *Lab Invest.* 2012 Nov;92(11):1597-606. doi: 10.1038/labinvest.2012.128. Epub 2012 Sep 10.

Hirose S, Hirayama C, Ikemi Y. The influence of emotional stress on the liver blood flow. *Kyushu J. Med. Sci.* 1961; 12: 319–23.

Holmin T, Ekelund M, Kullendorf CM, Lindfeldt J. A microsurgical method for denervation of the liver in rat. *Eur Surg Res* 1984; 16: 288–293.

Honda H, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Lang T, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology*. 2002 Jul;36(1):12-21.

Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H: Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest* 1998; 101: 2331–2339.

Hotamisligil GS: Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444: 860–867.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Plasma concentrations of a novel, adipose specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1595–1599.

Hsu CT, Schichijo K, Ito M, Sekine I. The effect of chemical sympathectomy on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in spontaneously hypertensive rats. *J Auton Nerv Syst*. 1993 May;43(2):91-6.

Hsu CT. The role of the autonomic nervous system in chemically-induced liver damage and repair--using the essential hypertensive animal model (SHR). *J Auton Nerv Syst*. 1995 Feb 9;51(2):135-42.

Hsu CT. The role of the sympathetic nervous system in promoting liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride, using the essential hypertensive animal (SHR). *J Auton Nerv Syst*. 1992 Mar;37(3):163-73.

Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology*. 2004;40:46–54.

Ilan Y. Leaky gut and the liver: a role for bacterial translocation in nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2012 Jun 7;18(21):2609-18. doi: 10.3748/wjg.v18.i21.2609.

Ito Y, Takahashi T, Tadokoro F, Hayashi K, Iino Z, Sato K, Akira K. Regeneration of the hepatic nerves following surgical denervation of the liver in dogs. *Liver*. 1998 Feb;18(1):20-6.

Jaskiewicz K, Voigt MD, Robson SC. Distribution of hepatic nerve fibers in liver diseases. *Digestion*. 1994;55(4):247-52.

Jeong, W.I., Jeong, D.H., Do, S.H., Kim, Y.K., Park, H.Y., Kwon, O.D., Kim, T.H. and Jeong, K.S. (2005) Mild hepatic fibrosis in cholesterol and sodium cholate diet-fed rats. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 235-242.

Jung BD, Kimura K, Kitamura H et al. Norepinephrine stimulates interleukin-6 mRNA expression in primary cultured rat hepatocytes. *J. Biochem.* 2000; 127: 205–9.

Kamada, Y., Tamura, S., Kiso, S., Matsumoto, H., Saji, Y., Yoshida, Y., Fukui, K., Maeda, N., Nishizawa, H., Nagaretani, H., Okamoto, Y., Kihara, S., Miyagawa, J., Shinomura, Y., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. (2003). Enhanced carbontetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 125, 1796–1807.

Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, Patsch JR, Tilg H. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2005 Jan;54(1):117-21.

Kim LR, Whelpdale K, Zurowski M, Pomeranz B. Sympathetic denervation impairs epidermal healing in cutaneous wounds. *Wound Repair Regen* 1998;6:194-201.

Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1313-21.

Koppe SW, Sahai A, Malladi P, Whittington PF, Green RM. Pentoxifylline attenuates steatohepatitis induced by the methionine choline deficient diet. *J Hepatol* 2004;41:592–598.

Kotronen A, Westerbacka J, Bergholm R, Pietiläinen KH, Yki-Järvinen H. Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Sep;92(9):3490-7. Epub 2007 Jun 26.

Lalor PF, Faint J, Aarbodem Y, Hubscher SG, Adams DH. The role of cytokines and chemokines in the development of steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2007 May;27(2):173-93. Review.

Lambert GW, Straznicky NE, Lambert EA, Dixon JB, Schlaich MP. Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome - causes, consequences and therapeutic implications. *Pharmacol Ther.* 2010 May;126(2):159-72. Epub 2010 Feb 19. Review.

Langin D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res.* 2006 Jun;53(6):482-91. Epub 2006 Mar 27. Review.

Larter CZ, Chitturi S, Heydet D, Farrell GC. A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: the metabolic movers. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010 Apr;25(4):672-90. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06253.x.

Larter CZ, Yeh MM. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Nov;23(11):1635-48. Epub 2008 Aug 21. Review.

Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol.* 2002 Aug;37(2):206-13.

Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 3012-3022

Li Z, Diehl AM. Innate immunity in the liver. *Curr Opin Gastroenterol.* 2003 Nov;19(6):565-71.

Li Z, Oben JA, Yang S, Lin H, Stafford EA, Soloski MJ, Thomas SA, Diehl AM. Norepinephrine regulates hepatic innate immune system in leptin-deficient mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2004 Aug;40(2):434-41.

Li Z, Soloski MJ, Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005 Oct;42(4):880-5.

Liao J, Keiser JA, Scales WE, Kunkel SL, Kluger MJ. Role of epinephrine in TNF and IL-6 production from isolated perfused rat liver. *Am J Physiol.* 1995 Apr;268(4 Pt 2):R896-901.

Lin YS, Nosaka S, Amakata Y, Maeda T. Comparative study of the mammalian liver innervation: an immunohistochemical study of protein gene product 9.5, dopamine beta-hydroxylase and tyrosine hydroxylase. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1995 Apr;110(4):289-98.

Lindfeldt J, Holmin T, Ahren B. Hepatic sympathetic denervation potentiates glucagon-stimulated glycogenolysis and hyperinsulinaemia in the rat. *J Auton Nerv Syst* 1987; 19: 211–217.

Liu J, Takase I, Hakucho A, Okamura N, Fujimiya T. Carvedilol attenuates the progression of alcohol fatty liver disease in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2012 Sep;36(9):1587-99. doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01773.x. Epub 2012 Mar 13.

Liu N, Zhang XL, Tian XP. Effects of norepinephrine on hepatic stellate cell proliferation and apoptosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2007 Oct;15(10):746-8.

Lönnqvist F, Thöme A, Nilsell K, Hoffstedt J, Arner P. A pathogenic role of visceral fat beta 3-adrenoceptors in obesity. *J Clin Invest.* 1995 Mar;95(3):1109-16.

Loria, P., Lonardo, A. and Targher, G. (2008) Is liver fat detrimental to vessels?: intersections in the pathogenesis of NAFLD and atherosclerosis. *Clin. Sci. (Lond)* 115, 1-12.

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980 Jul;55(7):434-8.

Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y: Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002; 8: 731–737.

Malmfors, T. and Sachs, C., Degeneration of adrenergic nerves produced by 6-hydroxydopamine, *Eur. J. Pharmacol.*, 3 _1968. 89–92.

Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology.* 2003 Apr;37(4):917-23.

Marí M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, Enrich C, Fernandez-Checa JC, García-Ruiz C. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab.* 2006 Sep;4(3):185-98.

Marra, F., Navari, N., Vivoli, E., Galastri, S., and Provenzano, A. (2011). Modulation of liver fibrosis by adipokines. *Dig. Dis.* 29, 371–376.

Matsunami, T., Sato, Y., Ariga, S., Sato, T., Kashimura, H., Hasegawa, Y., and Yukawa, M. (2010). Regulation of oxidative stress and inflammation by hepatic adiponectin receptor 2 in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 3, 472–481.

Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, Miyamoto K, Kaneko S. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology.* 2007 Nov;46(5):1392-403.

Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413–19.

McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2006 Mar;40 Suppl 1:S17-29.

McCuskey RS. Anatomy of efferent hepatic nerves. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004 Sep;280(1):821-6.

Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J* 2000;14:2097–107.

Minagawa M, Oya H, Yamamoto S, Shimizu T, Bannai M, Kawamura H, Hatakeyama K, Abo T. Intensive expansion of natural killer T cells in the early phase of hepatocyte regeneration after partial hepatectomy in mice and its association with sympathetic nerve activation. *Hepatology.* 2000 Apr;31(4):907-15.

Moghimzadeh E, Nobin A, Rosengren E. Fluorescence microscopical and chemical characterization of the adrenergic innervation in mammalian liver tissue. *Cell Tissue Res.* 1983;230(3):605-13.

Mohamed-Ali V, Bulmer K, Clarke D, Goodrick S, Coppack SW, Pinkney JH. beta-Adrenergic regulation of proinflammatory cytokines in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000 Jun;24 Suppl 2:S154-5.

Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Fagà E, Silli B, Pagano G. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2003 Apr;37(4):909-16.

Nagasawa T, Inada Y, Nakano S, Tamura T, Takahashi T, Maruyama K, Yamazaki Y, Kuroda J, Shibata N. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Eur J Pharmacol* 2006; 536: 182-191

Nakayama H, Otabe S, Ueno T, et al: Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism* 2007; 56: 470–475.7

Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 2010 Aug;52(2):774-88. doi: 10.1002/hep.23719.

Oben JA, Diehl AM. Sympathetic nervous system regulation of liver repair. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004 Sep;280(1):874-83.

Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Li Z, Torbenson M, Thomas SA, Diehl AM. Norepinephrine induces hepatic fibrogenesis in leptin deficient ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Aug 22;308(2):284-92.

Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut*. 2004 Mar;53(3):438-45.

Oben JA, Yang S, Lin H, Ono M, Diehl AM. Acetylcholine promotes the proliferation and collagen gene expression of myofibroblastic hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jan 3;300(1):172-7.

Oben JA, Yang S, Lin H, Ono M, Diehl AM. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Mar 21;302(4):685-90. Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells.

Omagari K, Kato S, Tsuneyama K, Inohara C, Kuroda Y, Tsukuda H, Fukazawa E, Shiraishi K, Mune M. Effects of a long-term high-fat diet and switching from a high-fat to low-fat, standard diet on hepatic fat accumulation in Sprague-Dawley rats. Dig Dis Sci. 2008 Dec;53(12):3206-12. Epub 2008 May 9.

Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, Akahori H, Misu H, Sakurai M, Zen Y, Nakanuma Y, Kaneko S. Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Gastroenterology. 2007 Jan;132(1):282-93.

Park BJ, Kim YJ, Kim DH, Kim W, Jung YJ, Yoon JH, Kim CY, Cho YM, Kim SH, Lee KB, Jang JJ, Lee HS. Visceral adipose tissue area is an independent risk factor for hepatic steatosis. J Gastroenterol Hepatol. 2008 Jun;23(6):900-7. Epub 2007 Nov 7.

Piñon M, Racotta IS, Ortiz-Butron R, Racotta R. Catecholamines in paraganglia associated with the hepatic branch of the vagus nerve: effects of 6-hydroxydopamine and reserpine. J Auton Nerv Syst. 1999 Feb 15;75(2-3):131-5.

Poniachik J, Csendes A, Diaz JC, et al. Increased production of IL-1alpha and TNF-alpha in lipopolysaccharide-stimulated blood from obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. Cytokine 2006;33:252-257

Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. Hepatology. 1990 Jan;11(1):74-80.

Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, Contos MJ, Sanyal AJ. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2007 Oct;46(4):1081-90.

Püschel GP. Control of hepatocyte metabolism by sympathetic and parasympathetic hepatic nerves. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2004 Sep;280(1):854-67.

Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2007 Jul 14;13(26):3540-53. Review.

Rasouli M, Mosavi-Mehr M, Tahmouri H. Liver denervation increases the levels of serum triglyceride and cholesterol via increases in the rate of VLDL secretion. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012 Feb;36(1):60-5. doi: 10.1016/j.clinre.2011.09.012. Epub 2012 Jan 20.

Rasouli M, Zahraie M. Suppression of VLDL associated triacylglycerol secretion by both alpha- and beta-adrenoceptor agonists in isolated rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol*. 2006 Sep 18;545(2-3):109-14. Epub 2006 Jul 5.

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006.

Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 2001;21:193–230

Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 May;290(5):G852-8. Review.

Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM: Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* 2008; 49: 1068–1076.

Rinella ME, Green RM: The methioninecholine deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol* 2004; 40: 47–51.

Rivera CA, Adegboyega P, van Rooijen N, Tagalicud A, Allman M, Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2007 Oct;47(4):571-9. Epub 2007 Jun 8.

Rojkind, M., Giambrone, M.A. and Biempica, L. (1979) Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* 76, 710-719.

Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*. 2012 Jan 1;52(1):59-69. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.003. Epub 2011 Oct 13.

Roskams T, Cassiman D, De Vos R, Libbrecht L. Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004 Sep;280(1):910-23.

Roskams T. Progenitor cell involvement in cirrhotic human liver diseases: from controversy to consensus. *J Hepatol.* 2003 Sep;39(3):431-4.

Sakamoto I, Takahashi T, Tadokoro F, Takahashi Y, Hayashi K, Ito Y, Iino Z, Kakita A. Immunohistochemical study of the regeneration process of extrinsic hepatic nerves following liver transplantation in rats. *Transplant Proc.* 2000 Nov;32(7):2352-4.

Satapathy SK, Garg S, Chauhan R, et al. Beneficial effects of tumor necrosis factor- α inhibition by pentoxifylline on clinical, biochemical, and metabolic parameters of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1946–1952

Schattenberg JM, Galle PR. Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man. *Dig Dis.* 2010;28(1):247-54. Epub 2010 May 7. Review.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 26746–26749.

Seematter G, Binnert C, Martin JL, Tappy L. Relationship between stress, inflammation and metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004 Mar;7(2):169-73.

Seki, S.; Kitada, T.; Yamada, T.; Sakaguchi, H.; Nakatani, K.; Wakasa, K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J. Hepatol.* 37:56–62; 2002.

Sharara-Chami RI, Zhou Y, Ebert S, Pacak K, Ozcan U, Majzoub JA. Epinephrine deficiency results in intact glucose counter-regulation, severe hepatic steatosis and possible defective autophagy in fasting mice. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Jun;44(6):905-13. doi: 10.1016/j.biocel.2012.02.016. Epub 2012 Mar 3.

Shindo N, Fujisawa T, Sugimoto K, et al. Involvement of microsomal triglyceride transfer protein in nonalcoholic steatohepatitis in novel spontaneous mouse model. *J Hepatol* 2010;52:903–912.

Sookoian, S. and Pirola, C.J. (2008) Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *J. Hepatol.* 49, 600-607.

Soyama A, Eguchi S, Hamada T, Takatsuki M, Kamohara Y, Kawashita Y, Hidaka M, Tokai H, Mochizuki S, Nagayoshi S, Kanematsu T. The impact of hepatic denervation on the accumulation of hepatic progenitor cells during liver regeneration in rats. *Hepatogastroenterology*. 2012 Jul-Aug;59(117):1577-9. doi: 10.5754/hge11598.

Straub RH, Grum F, Strauch U, Capellino S, Bataille F, Bleich A, Falk W, Schölmerich J, Obermeier F. Anti-inflammatory role of sympathetic nerves in chronic intestinal inflammation. *Gut* 2008 Jul;57(7):911-21. Epub 2008 Feb 28.

Straznicky NE, Lambert EA, Lambert GW, Masuo K, Esler MD, Nestel PJ. Effects of dietary weight loss on sympathetic activity and cardiac risk factors associated with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Nov;90(11):5998-6005. Epub 2005 Aug 9.

Swain MG. I. Stress and hepatic inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000 Dec;279(6):G1135-8

Tannapfel A, Denk H, Dienes HP, Langner C, Schirmacher P, Trauner M, Flott-Rahmel B. Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. Grade 2 consensus-based guidelines. *Pathologe*. 2010 May;31(3):225-37.

Targher, G. and Arcaro, G. (2007) Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 191, 235-240.

Tarrats,N., Moles,A., Morales,A., Garcia-Ruiz,C., Fernandez-Checa, J.C., and Mari,M.(2011). Critical role of tumor necrosis factor receptor1,but not 2, in Hepatic stellate cell proliferation, Extracellular matrix remodeling, and Liver fibrogenesis. *Hepatology* 54, 319–327.

Tavares FL, Seelaender MC. Hepatic denervation impairs the assembly and secretion of VLDL-TAG. *Cell Biochem Funct*. 2008 Sep-Oct;26(5):557-65. doi: 10.1002/cbf.1476.

Teff KL. Visceral nerves: vagal and sympathetic innervation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2008 Sep-Oct;32(5):569-71. doi: 10.1177/0148607108321705.

Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, Yerian LM, Neuschwander-Tetri BA: Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295:G987–G995.

Thoenen H. and Tranzer J.P., Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Pathol.*, 261_1968. 271–288.

Thörne A, Löfgren P, Hoffstedt J. Increased visceral adipocyte lipolysis--a pathogenic role in nonalcoholic fatty liver disease? *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Oct;95(10):E209-13. Epub 2010 Jul 21.

Tiegs G, Bang R, Neuhuber WL. Requirement of peptidergic sensory innervation for disease activity in murine models of immune hepatitis and protection by beta-adrenergic stimulation. *J Neuroimmunol.* 1999 May 3;96(2):131-43.

Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000;343:1467–1476

Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* 2010 Nov;52(5):1836-46. Review.

Tilg H. The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis.* 2010;28(1):179-85. doi: 10.1159/000282083. Epub 2010 May 7. Review

Timlin MT, Parks EJ Temporal pattern of de novo lipogenesis in the postprandial state in healthy men. *Am J Clin Nutr.* 2005 Jan;81(1):35-42.

Tomita K, Tamiya G, Ando S, et al. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut* 2006;55:415–424

Ueta CB, Fernandes GW, Capelo LP, Fonseca TL, Maculan FD, Gouveia CH, Brum PC, Christoffolete MA, Aoki MS, Lancellotti CL, Kim B, Bianco AC, Ribeiro MO. $\beta(1)$ Adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice. *J Endocrinol.* 2012 Sep;214(3):359-65. Epub 2012 Jun 22.

Uyama N, Geerts A, Reynaert H. Neural connections between the hypothalamus and the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004 Sep;280(1):808-20.

van der Poorten D, Milner KL, Hui J, Hodge A, Trenell MI, Kench JG, London R, Peduto T, Chisholm DJ, George J. Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease *Hepatology*. 2008 Aug;48(2):449-57.

Vere CC, Streba CT, Streba LM, Ionescu AG, Sima F. Psychosocial stress and liver disease status. *World J Gastroenterol*. 2009 Jun 28;15(24):2980-6.

Westerbacka J, Lammi K, Häkkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A, Yki-Järvinen H. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 May;90(5):2804-9. Epub 2005 Mar 1.

Wheatley AM, Shaw SG, Stuart ET, Zhao D, Gassel HJ, Blumgart LH. Selective sympathectomy of the liver: a comparison of orthotopic liver transplantation and intraportal 6-hydroxydopamine injection. *J Auton Pharmacol* 1993; 13: 15–22.

Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ: The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91–100.

Yamauchi T, Iwai M, Kobayashi N, Shimazu T. Noradrenaline and ATP decrease the secretion of triglyceride and apoprotein B from perfused rat liver. *Pflugers Arch*. 1998 Feb;435(3):368-74.

Yang Q, Zhang YW, Liu HY, Song YH, Tang WX. Effects of norepinephrine on the proliferation and activation of rat hepatic stellate cells. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2008 Nov;16(11):844-8.

Yesilova, Z.; Yaman, H.; Oktenli, C.; Ozcan, A.; Uygun, A.; Cakir, E.; Sanisoglu, S. Y.; Erdil, A.; Ates, Y.; Aslan, M.; Musabak, U.; Erbil, M. K.; Karaeren, N.; Dagalp, K. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Am. J. Gastroenterol*. 100:850–855; 2005.

Yi CX, la Fleur SE, Fliers E, Kalsbeek A. The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Apr;1802(4):416-31. doi: 10.1016/j.bbdis.2010.01.006. Epub 2010 Jan 11.

Young JB, Landsberg L. Diminished sympathetic nervous system activity in genetically obese (ob/ob) mouse. *Am J Physiol.* 1983 Aug;245(2):E148-54.

Yu YH, Ginsberg HN. Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circ Res.* 2005 May 27;96(10):1042-52. Review.

Zhan YT, An W. Roles of liver innate immune cells in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2010 Oct 7;16(37):4652-60.

Zhou M, Yang S, Koo DJ, Ornan DA, Chaudry IH, Wang P. The role of Kupffer cell alpha(2)-adrenoceptors in norepinephrine-induced TNF-alpha production. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Jul 27;1537(1):49-57.

10. Danksagung

Am Ende der Arbeit möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei einigen Personen zu bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen haben...

... bei meinem Doktorvater Hr. Prof. Dr. Reiner Wiest für die Überlassung des Themas, für alle Mühen, Ideen, die Bereitschaft, mir bei Fragen und Problemen zur Seite zu stehen, und für die freundliche und sehr menschliche Zusammenarbeit während des gesamten Projektes.

... bei meinem zu Beginn der Versuche Betreuer und Freund Hr. Dr. Lukas Moleda für die Vorarbeiten und die Einführung in das Tierexperiment.

... bei Fr. Anja Sabo und Fr. Christine Hechtel für die technische Unterstützung im Labor.

... bei Herrn Hubert Stangl für die Einführung in die Immunhistochemie.

... bei Hr. Dr. Christoph Dorn für die Hilfe bei den PCR-Versuchen und vielen anderen labortechnischen Fragen.

... bei Fr. PD Dr. Petra Rümmele für die Mitbeurteilung der histologischen Schnitte.

... bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Inge und Manfred, für die bedingungslose und uneingeschränkte Unterstützung, sei es in „psychologischer“, materieller oder finanzieller Hinsicht, nicht nur während meiner Promotionsarbeiten, sondern über mein ganzes Studium hinweg, die es mir ermöglicht haben, meinen Traum zu verwirklichen.

... und ganz besonders bei meiner Freundin und in naher Zukunft Frau Eva, für das „Dasein“ in guten und v.a. schlechten Zeiten, für die liebevollen Worte, Aufmunterungen und ihre Geduld, wofür ich von Herzen dankbar bin.

11. Curriculum Vitae

Michael Norbert Siegert

Geburtsdatum: 31.07.1986

Geburtsort: Hirschau, Oberpfalz, Bayern

Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang:

seit Mai 2013: Assistenzarzt für Orthopädie und Unfallchirurgie,
Klinikum St. Marien, Amberg

04.01.2013 Approbation als Arzt

Studium:

November 2012 Erfolgreiches Bestehen des zweiten Abschnitts der
ärztlichen Prüfung, Universität Regensburg

August 2011 – Juli 2012

Praktisches Jahr

- 09.04. – 29.07.2012 Innere Medizin
Universitätsklinikum Regensburg (Hämatologie/Onkologie
und Gastroenterologie)
- 19.12.2011 – 08.04.2012: Chirurgie
Klinikum St. Marien Amberg
Abteilung für Unfallchirurgie (Dr. R. Bauer)
Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie
(Prof. G. Späth)
- 29.08. – 18.12.2011: Orthopädie
Orthopädische Klinik der Universität Regensburg, Asklepios
Klinikum Bad Abbach (Prof. J. Grifka)

März 2009 – April 2011

Famulaturen

- März/April 2011: Abteilung für Allgemeinchirurgie, Universitätsklinikum
Regensburg
- September 2010: Notaufnahme, Universitätsklinikum Regensburg
- August 2010: Abteilung für Allgemeinchirurgie, Klinikum Weiden
- April 2010: Notfallzentrum, Barmherzige Brüder Regensburg
- März 2010: Abteilung für Unfallchirurgie, Barmherzige Brüder
Regensburg

• März/April 2009:	Orthopädische Praxis Eckhardt/Ritsch, Rosenheim
Juli 2009	Beginn der Promotionsarbeiten am Lehrstuhl für Innere Medizin I, Universität Regensburg (Doktorvater Prof. R. Wiest)
September 2008	Erfolgreiches Bestehen des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung (Physikum)
Oktober 2006	Beginn Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg
Zivildienst:	
September 2005 – Mai 2006	Sozialstation der Johanniter-Unfallhilfe, Amberg
Schulbildung:	
Juni 2005	Abitur
1996 – 2005	Erasmus-Gymnasium Amberg
1992 – 1996	Volksschule Freihung